



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NEUROGÉNESE IN VITRO E APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Trabalho submetido por
Vera Leal Santos Baptista de Figueiredo
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

outubro de 2016



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NEUROGÉNESE IN VITRO E APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Trabalho submetido por
Vera Leal Santos Baptista de Figueiredo
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Evguenia Bekman

outubro de 2016

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, a Prof. Doutora Evguenia Bekman, que me permitiu explorar uma área que eu apreciava há muito tempo, pelo seu apoio e pelas suas críticas.

Ao Hospital São Francisco Xavier, em especial à Dra. Brenda Madureira, Dra. Rosana Andrade e Dra. Alexandra Luís, por todo o conhecimento que partilharam comigo enquanto lá estive e pela disponibilidade sempre demonstrada.

À Farmácia Belém e toda a sua fantástica equipa por tão bem me terem acolhido, por todo o apoio, ensino e disponibilidade. Uma obrigada especial à Dra. Filipa Monte.

Às minhas amigas Carolina Grilo, Diana Pinho, Leonor Baptista e Susana Oliveira por demonstrarem que somos *outliers* daquele estudo que afirma que o círculo de amigos tem que mudar a cada 7 anos, e que a universidade não significa que tenhamos que seguir rumos diferentes em relação à amizade.

Aos meus avós maternos, Maria Francisca e Joaquim Leonardo, por se manterem sempre presentes durante este meu percurso.

Ao Miguel por ser sempre a minha rocha e a minha América do Norte mas a Sul.

RESUMO

A complexidade do sistema nervoso (SN) e a formação dos neurónios há muito que fascina o ser humano começando desde a Grécia antiga até aos modelos tridimensionais do cérebro obtidos em laboratório já possíveis hoje em dia.

As doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, Parkinson, Huntington e esclerose lateral amiotrófica, apesar de terem diferentes causas, resultam na degeneração de um tipo de neurónios ou num local específico e a terapia celular, nomeadamente o transplante, com células estaminais neurais (NSC) é uma possível estratégia para diminuir os sintomas e aumentar a qualidade de vida dos doentes.

Actualmente, a neurogénese e a diferenciação neural *in vitro* servem como modelo para o estudo das doenças neurodegenerativas e das fases iniciais do desenvolvimento neuronal nos humanos, podendo também ser utilizadas para estudar os efeitos de substâncias exógenas com o objectivo de descobrir novos fármacos. São diferentes os métodos possíveis de ser utilizados para a obtenção de NSC variando em complexidade e heterogeneidade, mas novas técnicas, como a utilização do matrigel, aproxima-nos cada vez mais do modelo do cérebro humano, apesar das limitações ainda encontradas.

Sendo obtidas através de quatro fontes principais de células, nomeadamente a partir das células embrionárias estaminais (ES), células estaminais pluripotentes induzidas (iPS) e das áreas germinativas do cérebro fetal e adulto, as NSC oferecem uma potencial fonte ilimitada de células para várias terapias baseadas em células, não só para as doenças neurodegenerativas, mas também para traumatismos da medula espinhal, terapia pós-acidente vascular e cerebral e mesmo terapia anticancerígena.

Palavras-chave: neurogénese *in vitro*, células estaminais neurais, diferenciação neuronal, doenças neurodegenerativas

ABSTRACT

The complexity of the nervous system (NS) and the formation of neurons have long fascinated humans beginning from ancient Greece to the three-dimensional brain models already possible to obtain in laboratories nowadays.

Neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis, despite having different causes, result in the degeneration of one type of neuron or at a specific site and cell therapy, including transplantation with neural stem cells (NSC), is one possible strategy to reduce symptoms and increase the patients' quality of life.

At the present time, *in vitro* neurogenesis and neuronal differentiation serve as a model for the study neurodegenerative diseases and early stages of neuronal development in humans, and can also be used to study the effects of exogenous substances with the aim of finding new drugs. There are different possible methods to be used for obtaining neural stem cells (NSC), varying in complexity and heterogeneity, but with the recent techniques, such as the use of matrigel, we are approaching more and more to the human brain model, despite the limitations still present.

NSC can be obtained through four main sources of cells, namely from embryonic stem (ES) cells, induced pluripotent stem (iPS) cells and germinal areas of fetal and adult brain, all of them being able to provide a potentially unlimited source of cells for various cell-based therapies, not only for neurodegenerative diseases also for spinal cord injuries, post-stroke and even anticancer therapy.

Keywords: *in vitro* neurogenesis, neural stem cells, neuronal differentiation, neurodegenerative diseases

ÍNDICE GERAL

Lista de Abreviaturas.....	4
Introdução.....	6
1. Sistema Nervoso.....	7
1.1 Componentes do Sistema Nervoso.....	7
1.1.1 Neurónio.....	7
1.1.2 Neuroglia.....	9
1.2 Desenvolvimento Neural e Regeneração.....	10
1.2.1 Sinalização.....	11
2. Neurogénese.....	13
2.1 Células Estaminais Neurais.....	14
3. Doenças Neurodegenerativas.....	16
3.1 Doença de Alzheimer.....	16
3.2 Doença de Huntington.....	17
3.3 Doença de Parkinson.....	18
3.4 Esclerose Lateral Amiotrófica.....	19
4. Neurogénese <i>in vitro</i>	20
4.1 Fontes de Células.....	21
4.2 Diferenciação Neural <i>in vitro</i>	25
5. Aplicações Biomédicas.....	29
5.1 Aplicações na DA.....	29
5.2 Aplicações na DH.....	31
5.3 Aplicações na DP.....	32
5.4 Aplicações na ELA.....	34
5.5 Outras aplicações.....	35
6. Perspectivas Futuras.....	38
Bibliografia.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

APP	<i>Amyloid precursor protein</i> – Proteína precursora amilóide
BDFN	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> – Factor neurotrófico cerebral
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> – Proteína morfogénica óssea
BLBP	<i>Brain lipid-binding protein</i> – Proteína cerebral de ligação dos lípidos
BP	<i>Basal progenitor</i> – Progenitor basal
CN	Crista Neural
DA	Doença de Alzheimer
DH	Doença de Huntington
DP	Doença de Parkinson
EB	<i>Embryoid body</i> – corpo embrióide
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> – Factor de crescimento epidérmico
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
ES	<i>Embryonic stem</i> – Estaminal embrionária
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> – Factor de crescimento de fibroblastos
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> - Proteína ácida fibrilar glial
h-ESC	<i>Human Embryonic Stem Cell</i> – Célula estaminal embrionária humana
HTT	Huntingtina
iPS	<i>Induced pluripotent stem</i> – (Célula) estaminal pluripotente induzida
L-dopa	Levodopa
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i> – Factor inibitório leucémico
NEP	<i>Neuroepithelial progenitor</i> – Progenitor neuroepitelial
NGF	<i>Nerve growth factor</i> – Factor de crescimento nervoso
NSC	<i>Neuro Stem Cell</i> – Célula Estaminal Embrionária
PA	Progenitores adultos
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
RA	<i>Retinoic acid</i> – Ácido retinóico
RG	<i>Radial glia</i> – Glia radial
SC	<i>Stem Cell</i> – Célula estaminal
SFEB	<i>Serum-free embryoid body (culture)</i> – Cultura de corpos embrióides em meio isento de soro

Shh	Sonic Hedgehog
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TGF	<i>Transforming growth factor</i> – Factor Transformador de Crescimento
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> – Factor de crescimento celular endotelial vascular
ZSG	Zona Subgranular
ZSV	Zona Subventricular

INTRODUÇÃO

Desde os tempos da Grécia Antiga (século IV A.C.) que se acredita que o cérebro está envolvido não apenas na área sensorial, mas também no que diz respeito à inteligência (Bear, Connors, & Paradiso, 2015).

Apesar de Theodor Schwann ter proposto a teoria celular em 1830, foi apenas no século XX que a célula nervosa, o neurónio, foi reconhecida como a unidade básica do sistema nervoso (SN) (Bear et al., 2015; Purves et al., 2004). A principal dificuldade dos cientistas da altura era a necessidade em obter fatias de tecido cerebral muito finas, o que se tornava muito complicado devido à sua consistência pouco firme. Isto foi ultrapassado no início do século XIX com a invenção do micrótomo e a técnica de imersão de tecido cerebral em formaldeído. Houve novamente um grande avanço em 1873 com a introdução da coloração de Camillo Golgi com sais de prata que permitiu uma coloração selectiva de certas células do tecido cerebral (Bear et al., 2015; Kandel, Schwartz, Jessell, Siegelbaum, & Hudspeth, 2013).

No final do século XIX iniciou-se o debate sobre a unidade básica do sistema nervoso com Golgi a afirmar que se tratava de um sistema de rede semelhante ao sistema vascular e, por outro lado, Santiago Ramón y Cajal a argumentar que a comunicação entre neurónios se fazia por contacto em vez de continuidade e que os neurónios eram células independentes. Este debate manteve-se até meados de 1950 e foi resolvido com a introdução do microscópio electrónico, com um poder de ampliação muito superior, que veio eventualmente dar razão a Ramón y Cajal (Bear et al., 2015; Kandel et al., 2013; Purves et al., 2004).

Nas últimas décadas, os avanços tecnológicos têm aberto novos horizontes para o estudo científico do cérebro humano (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, 2015) e à medida que o conhecimento nesta vasta área da neurociência aumenta, surgem novos potenciais terapêuticos através da utilização da neurogênese e do desenvolvimento neural *in vitro* para certas doenças, como por exemplo a possibilidade de recorrer à neurogênese para o tratamento das doenças neurodegenerativas ou os modelos de estruturas tridimensionais para melhorar estudar estas doenças.

1. SISTEMA NERVOSO

O SN humano, como o de todos os mamíferos, está dividido em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP) (Haines, 2013).

Os estudos de Cajal, de Golgi, e dos seus sucessores levaram a um maior consenso de que as células do SN podem ser divididas em duas grandes categorias nomeadamente as células nervosas (ou neurónios) e células de suporte chamadas células gliais, neuroglia, ou simplesmente glia. Os neurónios são especializados na transmissão sináptica a longas distâncias ao contrário da neuroglia, que não participa directamente na mesma mas, no entanto, tem várias funções essenciais no desenvolvimento e no cérebro adulto (Purves et al., 2004).

O SNC humano é uma estrutura altamente complexa composta por um grande número de neurónios (10^{11}) e um número ainda maior de células gliais (10^{12}) (Kandel et al., 2013), abrangendo o cérebro (hemisférios cerebrais, diencefalo, cerebelo e tronco cerebral) e a medula espinhal enquanto que o SNP inclui os neurónios sensoriais que se estendem e ligam a receptores sensoriais na superfície ou em zonas mais profundas do corpo, transportando a informação de e para o SNC (Purves et al., 2004).

1.1 COMPONENTES DO SISTEMA NERVOSO

1.1.1 NEURÓNIO

O neurónio é um tipo de célula altamente especializada e é o elemento celular essencial no SNC. A organização celular base dos neurónios é semelhante às outras células, mas distingue-se claramente pela sua especialização em comunicação intercelular. Assim, apesar de existirem neurónios com uma grande variedade de tamanhos e formas, a sua estrutura base é composta por um corpo celular, ou soma, dendrites e axónio (Purves et al., 2004; Vander, Sherman, & Luciano, 2001).

O corpo celular é o centro metabólico da célula e contém os mesmos organitos encontrados em todas as células animais: núcleo, retículo endoplasmático rugoso, retículo endoplasmático liso, aparelho de Golgi e mitocôndrias. O corpo da célula origina várias curtas dendrites e um longo axónio. O conjunto dos vários corpos celulares dos neurónios constitui a substância cinzenta do SNC (Bear et al., 2015; Haines, 2013; Kandel et al., 2013).

As dendrites são a maior evidência da especialização neuronal para comunicação via sinalização eléctrica (Purves et al., 2004). A sua ramificação em forma de árvore para

a recepção de sinais eléctricos de outros neurónios é a razão pela qual têm este nome derivado da palavra grega para árvore (Bear et al., 2015; Kandel et al., 2013). Esta extensa arborização das dendrites permite aumentar a área de superfície de recepção da célula e, deste modo, aumentar a sua capacidade de recepção de sinais de uma grande quantidade de outras células neuronais vizinhas (Vander et al., 2001).

Enquanto o corpo celular e as dendrites podem ser caracterizados como domínios do neurónio aferentes, o axónio é responsável pela transmissão de informações neurais (Squire et al., 2013). A parte do axónio mais próxima ao corpo celular em conjunto com a parte do corpo celular onde o axónio se liga é conhecida como o segmento inicial e é aqui que, na maioria dos neurónios, são gerados os sinais eléctricos que se propagam ao longo do axónio ou, às vezes, das dendrites, a velocidades de 1 a 100 m/s. Os axónios variam em comprimento, podendo estender-se em mais de 2 metros dentro do corpo sendo que, comparando com o diâmetro do corpo da célula (50mm ou mais), a maioria dos axónios no SNC é muito fina, tendo um diâmetro compreendido entre 0,2µm e 20µm. Para aumentar a velocidade do potencial de acção, os axónios são envolvidos por uma bainha de isolamento de mielina que é interrompida em intervalos regulares pelo nódulos de Ranvier onde é regenerado o potencial de acção. Deste modo, um axónio pode transmitir sinais eléctricos ao longo de distâncias que variam de 0,1mm a 2m (Kandel et al., 2013; Vander et al., 2001). De forma semelhante à constituição da substância cinzenta, o conjunto de axónios envolvidos em mielina, por sua vez, constitui a substância branca do SNC (Haines, 2013).

O axónio principal pode ter ramificações colaterais ao longo do seu comprimento e, perto das extremidades, tanto o axónio principal como os colaterais podem subdividir-se ainda mais. Quanto maior for o grau de ramificação do axónio e de axónios colaterais, maior será a esfera de influência do neurónio. Cada ramificação termina num axónio terminal responsável pela libertação de neurotransmissores para as dendrites ou corpo celular de outro neurónio (Vander et al., 2001). A célula nervosa que transmite o sinal é chamada de célula pré-sináptica e a célula que recebe o sinal é a célula pós-sináptica, separadas pela fenda sináptica onde ocorre a transferência sináptica. Na maioria das sinapses, a informação sob a forma de impulso eléctrico é convertida no terminal num sinal químico sob a forma de neurotransmissores que atravessam a fenda sináptica. Seguidamente, na membrana pós-sináptica, este sinal químico é novamente convertido para um sinal eléctrico (Bear et al., 2015; Kandel et al., 2013).

1.1.2 NEUROGLIA

O termo “neuroglia” foi criado em 1859 por Rudolph Virchow e, assim como as dendrites, tem na sua origem a palavra grega “cola” devido à convicção, na altura, que estas células serviam fundamentalmente como material de suporte para manter a coesão das células do SN (Kandel et al., 2013; Purves et al., 2004; Squire et al., 2013).

As células da glia excedem largamente o número de neurónios existentes no SNC dos vertebrados, sendo o seu número entre 2 a 10 vezes superior (Kandel et al., 2013). Este tipo de células, ao contrário do que se pensava no século XIX, tem uma variedade de funções como o controlo do ambiente no qual os neurónios do SNC funcionam através do transporte de nutrientes dos vasos sanguíneos para os neurónios, a remoção de resíduos, a manutenção do meio iónico dos neurónios, a modulação da taxa de propagação do sinal nervoso, o controlo da absorção de neurotransmissores na fenda sináptica, e também têm um papel significativo no auxílio da recuperação em caso de lesão neural e no desenvolvimento neural (durante o desenvolvimento do SN a neuroglia não só orienta a migração neuronal como também promove a formação de sinapses) (Haines, 2013; Purves et al., 2004).

A neuroglia difere funcionalmente e morfologicamente do neurónio, uma vez que não forma nem dendrites nem axónios. Embora sejam ambos originados a partir das mesmas células embrionárias precursoras, a neuroglia, ao contrário dos neurónios, não tem as mesmas propriedades de membrana e não é electricamente excitável, não estando directamente envolvida na sinalização eléctrica. Estas células podem, no entanto, comunicar-se directamente com os neurónios nas proximidades através de receptores gliais e mecanismos de libertação de certos neurotransmissores (Kandel et al., 2013).

Existem três tipos de células gliais no SNC maduro: astrócitos, oligodendrócitos e microglia. Os astrócitos, apenas presentes no cérebro e medula espinhal, têm uma aparência de estrela, daí o prefixo “astro”. Uma das suas principais funções é manter um ambiente químico adequado para sinalização neuronal, regulando a composição do fluido extracelular do SNC através da remoção de iões de potássio e neurotransmissores em torno das sinapses e sustentando metabolicamente os neurónios através do fornecimento, por exemplo, de glucose e da remoção de amoníaco. No desenvolvimento do embrião, os astrócitos ainda ajudam a estimular o crescimento dos neurónios através da secreção de factores de crescimento. Os oligodendrócitos, também restritos ao SNC, têm como função a mielinização dos axónios. No SNP, as células que elaboram mielina são as células de Schwann, podendo-se dizer que são, então, os correspondentes aos oligodendrócitos no

SNP. Por último, a microglia tem uma função imunológica do SNC e constitui cerca de 1% da população de células do SNC (Haines, 2013). São células provenientes maioritariamente de células precursoras hematopoiéticas e partilham muitas propriedades com macrófagos encontrados noutros tecidos, como a remoção dos detritos celulares e a segregação de moléculas de sinalização, particularmente uma vasta gama de citocinas (Purves et al., 2004; Vander et al., 2001).

1.2 DESENVOLVIMENTO NEURAL E REGENERAÇÃO

Um dos maiores sucessos da biologia do século XIX foi a demonstração de Karl Ernst von Baer que as etapas iniciais da embriogénese são essencialmente as mesmas em todos os vertebrados (Larry W. Swanson, 2000). No embrião, o SNC e o coração são os primeiros órgãos a diferenciar-se e as divisões básicas do SNC no início do desenvolvimento também são comuns a todos os vertebrados (Squire et al., 2013).

As células progenitoras que formam o SN de vertebrados têm a sua origem relativamente cedo, desenvolvendo-se a partir da parte dorsal da ectoderme que, durante a gastrulação, cobre o exterior do embrião e recebe sinais da mesoderme (Ladher & Schoenwolf, 2005; Squire et al., 2013). A placa neural é formada pelo espessamento da parte dorsal da ectoderme. Durante um processo morfogenético complexo chamado neurulação, as células da placa neural começam a enrolar-se e acabam por originar o tubo neural formado por uma camada de epitélio pseudoestratificado chamada de neuroepitélio, constituído por progenitores neuroepiteliais. O tubo neural estende-se sobre a notocorda (mesoderme axial), flanqueado por mesoderme pre-somítica que formará sómitos, que por sua vez darão origem à derme, ao músculo, ao osso e à cartilagem. As células progenitoras do tubo neural são as células precursoras neurais que dão origem às células estaminais neuronais (NSC) com a capacidade de dar origem a neurónios, astrócitos e oligodendrócitos (Götz & Huttner, 2005; Kandel et al., 2013; Purves et al., 2004; Squire et al., 2013; Stuhlmiller & García-Castro, 2012).

Antes do nascimento é quando se dá a maior parte da divisão dos neurónios precursores e depois do início da infância, os novos neurónios são formados a um ritmo muito mais lento de maneira a substituir os que morrem. No entanto, os axónios que tenham sido cortados podem reparar-se e recuperar as suas funções desde que o dano tenha ocorrido fora do SNC e não afecte o corpo celular do neurónio. Após uma lesão que seja reparável, o segmento do axónio agora separado do corpo celular do neurónio acaba

por degenerar, mas a parte proximal do axónio ainda ligada ao corpo celular cresce e consegue regenerar-se, ligando-se aos neurónios que tinha como destino anteriormente. Uma vez que nos humanos as lesões da coluna vertebral regra geral esmagam o tecido em vez de o cortar, ocorre apoptose com perda completa de função (Vander et al., 2001).

Hoje em dia, os investigadores estão a investigar hipóteses de proporcionar um ambiente favorável à regeneração axonal no SNC uma vez que, ao contrário dos anfíbios e dos peixes (Becker & Becker, 2014), os axónios do SNC dos mamíferos não se conseguem regenerar após se terem danificado. A regeneração no SNC adulto requer a sobrevivência do neurónio ferido e o crescimento do axónio danificado até ao alvo neuronal original. Uma vez feito contacto, o axónio precisa de ser remielinizado e formar sinapses funcionais (Horner & Gage, 2000). Assim, estratégias para regenerar neurónios no SNC incluem transplante celular, acção de factores neurotróficos que estimulam o tecido neuronal, orientação axonal e remoção de inibição do crescimento, manipulação de sinalização intracelular, pontes e substratos artificiais e modulação da resposta imune (Brewer, Bethea, & Yeziarski, 1999; Cheng, Cao, & Olson, 1996; MacDonald et al., 1999; McTigue, Horner, Stokes, & Gage, 1998; Stichel & Müller, 1998).

1.2.1 SINALIZAÇÃO

A indução da crista neural (CN) durante a embriogénese envolve a mesoderme, a camada de tecido existente por baixo da ectoderme, juntamente com a placa neural e a parte da ectoderme que dá origem a tecido não neural. Isto é feito através de uma combinação de sinais que modulam a expressão de certos genes, nomeadamente através do ácido retinóico (RA), proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) da família dos factores transformadores de crescimento (TGF), factores de crescimento de fibroblastos (FGF) e vias de sinalização Wnt, Notch/Delta e a molécula sinalizadora Sonic Hedgehog (Shh) (A. Liu & Niswander, 2005; Purves et al., 2004; Stuhlmiller & García-Castro, 2012).

Cada uma destas moléculas é produzida por uma variedade de tecidos embrionários, ligando-se aos receptores das células vizinhas. Um dos sinais, o BMP, funciona como regulador negativo em vez de indutor positivo, isto é, a sua actividade converte a ectoderme em epiderme e portanto a sua inibição é necessária à indução neural (Ladher & Schoenwolf, 2005; Rogers, Moody, & Casey, 2009; Wilson & Hemmati-Brivanlou, 1995). Alguns destes sinais não são libertados de maneira homogénea ao longo do tubo neural, como é o caso do BMP, RA e Shh. Estes sinais são libertados em forma

de gradiente, formando uma polaridade no tubo neural em que o BMP e o Shh são libertados a partir da parte dorsal e da parte ventral, junto à notocorda, respectivamente. Por outro lado, o RA é libertado lateralmente pelos somitos (Bushati & Briscoe, 2012; Chamberlain, Jeong, Guo, Allen, & McMahon, 2008).

Como resultado destas sinalizações ocorrem mudanças na forma, motilidade, e na expressão de genes nas células alvo dando origem a células neuronais e gliais de diferentes tipos. Como exemplo, o Shh é essencial para a diferenciação de neurónios motores, bem como de algumas classes de neurónios e células da glia na parte anterior do cérebro (Ericson, Morton, Kawakami, Roelink, & Jessell, 1996). O BMP é importante para o estabelecimento da identidade de células dorsais da medula espinhal (Purves et al., 2004).

2. NEUROGÉNESE

A neurogénese, como a própria palavra indica, é o processo através do qual novos neurónios são formados a partir de células progenitoras ou células estaminais (SC). Uma SC é uma célula não diferenciada, pluri ou multipotente, com capacidade de proliferação, auto-renovação, diferenciação num grande número de células funcionais maduras de diferentes linhagens e de regeneração de tecidos (Potten & Loeffler, 1990).

Durante o seu desenvolvimento, as SC na zona proliferativa do cérebro em desenvolvimento podem sofrer divisões simétricas, dando origem a duas células filhas com destinos semelhantes, ou divisões assimétricas que dão origem a uma SC semelhante à célula mãe e um precursor neuronal, o neuroblasto, que não vai sofrer mais nenhuma divisão celular posterior. As divisões simétricas têm uma natureza proliferativa, cujo objectivo é aumentar a população de células progenitoras antes do início da neurogénese e mais tarde manter o número de precursores (McConnell, 1995). A duração desta fase determina, então, a quantidade de precursores neurais assim como o tamanho do cérebro (Rakic, 1995). Como os neurónios geralmente são incapazes de reverter no ciclo celular, o ponto em que um precursor neuronal deixa o ciclo define a data de nascimento do neurónio resultante (Kintner, 2002; Purves et al., 2004).

Antes do processo de neurogénese ocorrer, como já foi referido, o neuroepitélio é apenas constituído por uma camada de células pseudoestratificada, na qual os núcleos das células migram entre a parte apical e a parte basal enquanto o ciclo celular se processa. Com a formação de neurónios, o neuroepitélio transforma-se num tecido com várias camadas de células, e a camada mais apical de células contendo a maior parte de células progenitoras é chamada de zona ventricular, sendo este o local primário da neurogénese do SNC (Götz & Huttner, 2005; Hinds & Ruffett, 1971; Squire et al., 2013).

Tanto os neurónios do SNP como do SNC são formados a partir do tubo neural e dobras do tubo neural. No entanto, as células do SNP destacam-se em primeiro lugar do neuroepitélio, a partir da CN, e migram para os tecidos não neuronais em desenvolvimento, onde irão formar as vias dos axónios periféricos. Enquanto isso, as células precursoras do SNC começam a estabelecer as regiões do cérebro e da medula espinhal que depois vão receber a informação sensorial do SNP e estabelecer circuitos cerebrais (Squire et al., 2013).

No ser humano, a grande maioria dos neurónios neocorticais nasce entre a quinta semana e o quinto mês de gestação, podendo atingir a uma taxa de 250 000 novos neurónios por minuto. Durante muito tempo, considerava-se inexistente a ocorrência da

neurogénese no cérebro de um mamífero adulto, mas algumas regiões restritas do cérebro adulto mantêm a capacidade de gerar novos neurónios e onde estão presentes as NSC. É o caso da zona subventricular (ZSV), localizada entre o ventrículo lateral e a parênquima do estriado e cujo destino final é o bulbo olfactório nos roedores (Altman, 1969), e a zona subgranular (ZSG) do giro dentado (Bayer, Yackel, & Puri, 1982; Bear et al., 2015; Götz, 2003; Grassi Zucconi & Giuditta, 2002; Lois & Alvarez-Buylla, 1994; Luskin, 1993; Rakic, 1995).

2.1 CÉLULAS ESTAMINAIS NEURAIS

Como já foi supramencionado, as NSC são populações de células multipotentes com capacidade de auto-renovação suficiente para fornecer os números de células necessárias ao cérebro e têm a capacidade de se diferenciarem em neurónios, astrócitos e oligodendrócitos (McKay, 1997). As NSC foram originalmente isoladas a partir da ZSV em 1992 (Reynolds & Weiss, 1992).

In vivo, as NSC existem em nichos, ou seja, em microambientes multicelulares que fornecem os factores necessários para manter a auto-renovação das células estaminais e direccionar a sua diferenciação, regulando assim o equilíbrio entre a auto-renovação e a divisão simétrica e assimétrica (Garcion, Halilagic, Faissner, & Ffrench-Constant, 2004).

Existem quatro tipos de NSC, ou progenitores neurais, que se podem distinguir no cérebro: os progenitores neuroepiteliais (NEPs), glia radial (RG), progenitores basais (BP) e progenitores adultos (PA). Os NEPs já foram mencionados anteriormente, são células alongadas em contacto com a parte apical e basal da única camada do neuroepitélio. Inicialmente dividem-se de forma simétrica com o objectivo de aumentar o número de células progenitoras, sendo responsáveis pela primeira onda de neurogénese no tubo neural, após a qual dão origem à RG e aos BPs (Conti & Cattaneo, 2010).

A RG é o tipo de célula principal no cérebro em desenvolvimento, servindo tanto como progenitores neurais e como de suporte para a migração de neurónios recém-formados. A RG expressa marcadores gliais, tais como o transportador de glutamato e aspartato GLAST (Shibata et al., 1997), proteína acídica fibrilar glial (GFAP) (Xiuxin Liu, Bolteus, Balkin, Henschel, & Bordey, 2006), apenas presente em humanos e primatas, e a proteína cerebral de ligação dos lípidos (BLBP), também conhecida como FABP7 (Feng, Hatten, & Heintz, 1994). O potencial de diferenciação destas células,

apesar de serem capaz de gerar neurónios, células da glia e oligodendrócitos, é mais restrito que o do NEPs, podendo dividirem-se tanto simétrica como assimetricamente (Conti & Cattaneo, 2010).

Os BPs são precursores neurogénicos predominantemente presentes na ZSV do telencéfalo em desenvolvimento, gerados inicialmente a partir dos NEPs e posteriormente pela RG. Não têm contacto nem com a superfície apical nem com a basal do neuroepitélio e podem passar por uma ou duas divisões simétricas, originando um ou dois pares de neurónios. São, então, os progenitores neurogénicos que servem para aumentar a produção de neurónios (Conti & Cattaneo, 2010).

Os PA são uma população de células neurais multipotentes presentes no cérebro dos mamíferos adultos na ZSV e na ZSG e por isso são consideradas as células estaminais adultas. Estas células provêm directamente da RG e têm como função manter a neuro e glicogénese ao longo da vida adulta (Conti & Cattaneo, 2010). Os PA podem dividir-se em dois tipos morfológica e funcionalmente diferentes. O tipo B, frequentemente denominado de astrócito pelas características e marcadores semelhantes aos astrócitos, como a expressão do GFAP e GLAST (Platel, Gordon, Heintz, & Bordey, 2009), está em contacto íntimo com todos os outros tipos de células na ZSV. As células de tipo B, após proliferação, originam as células de tipo C (Doetsch, Caillé, Lim, García-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 1999) que são progenitores transitórios em rápida divisão e que dão origem às células tipo A, neuroblastos imaturos mas já diferenciados que depois migram para o bulbo olfactório (Belluzzi, Benedusi, Ackman, & LoTurco, 2003; Conti & Cattaneo, 2010; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009; Lois & Alvarez-Buylla, 1994). As células tipo B são as células mais importantes dos PA uma vez que são capazes de originar novos neuroblastos quando há redução de neurónios (Doetsch et al., 1999; Doetsch, Petreanu, Caille, Garcia-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 2002).

3. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

As doenças neurodegenerativas com a doença de Alzheimer (DA), doença de Huntington (DH), a doença de Parkinson (DP) e a esclerose lateral amiotrófica (ELA) são provocadas por perdas de neurónios e células gliais do cérebro ou medula espinhal (S. U. Kim, Lee, & Kim, 2013). Apesar das suas distintas manifestações clínicas, estas doenças têm geralmente início na meia-idade ou nos últimos anos de vida, ocorrem quer como uma doença hereditária ou esporádica e caracterizam-se pela agregação e deposição de proteínas alteradas tanto intra como extracelularmente (Mayeux, 2003).

Como estas doenças são provocadas pela degeneração de um tipo de neurónios ou num local específico, como abordado já de seguida, a terapia celular, nomeadamente o transplante, com NSC é uma possível estratégia obtendo-se simultaneamente um efeito neuroprotector e regenerativo.

3.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é caracterizada pela degeneração e perda de neurónios nos núcleos do cérebro anterior basal, córtex cerebral, hipocampo e amígdala causando uma redução significativa da actividade da acetilcolina-transferase. Ocorre também acumulação extracelular de depósitos de placas de proteína β -amilóide e, intracelularmente, a formação de emaranhados neurofibrilares ricos em proteína tau anormalmente hiperfosforilada (Dickson, 2001; Haines, 2013; Hardy & Selkoe, 2002; S. U. Kim et al., 2013; Mayeux, 2003; Phillips, Michell, & Barker, 2006; Tanzi & Bertram, 2005).

As causas da doença incluem diversos factores de risco como o consumo de álcool e tabaco, a educação, exercício físico e mental (Lindsay et al., 2002; Merchant et al., 1999; Stern et al., 1994), assim como mutações genéticas nomeadamente no gene da proteína precursora amilóide (APP) no cromossoma 21, no gene presenilina 1 (PS1) no cromossoma 14, sendo este o mais frequente, e no gene presenilina 2 (PS2) no cromossoma 1 (Dickson, 2001; Rogaeva et al., 2001).

O início da doença manifesta-se pela perda de memória, podendo alguns doentes apresentar também outra sintomatologia, como desorientação de visão espacial, distúrbios de linguagem. Os doentes podem desenvolver também depressão e a doença progride com o declínio das capacidades intelectuais evoluindo para comportamentos erráticos, delírios e perda de controlo sobre funções corporais fazendo com que os doentes

fiquem acamados, mudos e incontinente, totalmente inconscientes dos seus arredores (Dickson, 2001; Haines, 2013; Mayeux, 2003).

Estima-se que em Portugal, a prevalência da demência se situava à volta dos 5,91% em 2013, aumentando consideravelmente com a idade, principalmente a partir dos 75 anos. Este valor equivalia a cerca de 160287 pessoas com demência no nosso país, e sabendo que 50 a 70% são responsáveis pela DA, foi possível concluir que em Portugal e em 2013, existiriam entre 80144 e 112201 pessoas com esta doença (Santana, Farinha, Freitas, Rodrigues, & Carvalho, 2015).

Uma possível abordagem para esta doença é a diminuição dos níveis de proteína β -amilóide no cérebro, sendo que há evidência experimental que indica que certas proteinases como a neprilisina (Eckman, Watson, Marlow, Sambamurti, & Eckman, 2003; Farris et al., 2003; Iwata et al., 2001), plasmina (Jacobsen et al., 2008; Melchor, Pawlak, & Strickland, 2003) e catepsina B (Mueller-Steiner et al., 2006) podem ser utilizadas como agentes terapêuticos.

Por outro lado, também se podem utilizar pequenas moléculas inibidoras da acetilcolinesterase, como é o caso da tacrina, donepezilo, rivastigmina e galantamina, com o objectivo de aumentar a concentração de acetilcolina (Ibach & Haen, 2004; Musiał, Bajda, & Malawska, 2007; Racchi, Mazzucchelli, Porrello, Lanni, & Govoni, 2004; Recanatini & Valenti, 2004).

3.2 DOENÇA DE HUNTINGTON

A DH é uma doença neurodegenerativa autossómica dominante cujo sinal mais característico é a coreia (da palavra grega para “dança”), ou seja, movimentos espontâneos, incontroláveis e involuntários, semelhantes a contracções que envolvem várias partes do corpo. Apesar dos movimentos involuntários excessivos, os movimentos voluntários dos doentes com DH são mais lentos do que o normal. Envolve também alterações comportamentais, psíquicas e, por fim, a demência. As manifestações clínicas geralmente surgem entre as idades de 30 e 50 e a doença progride cronicamente terminando na morte cerca de 10 a 15 anos após o início da sintomatologia. Não existe um tratamento para além dos cuidados paliativos sintomáticos como a triaprida e outros fármacos neurolépticos (Bear et al., 2015; Mumenthaler & Mattle, 2006; Squire et al., 2013).

Esta doença é causada pela perda de neurónios no corpo estriado e, em 1983, foi descoberto o gene e proteína associados a esta patologia, a huntingtina (HTT) (Gusella et al., 1983; Squire et al., 2013). Uma vez que tem uma causa genética, a sua prevalência pode variar dependendo da população em estudo e é possível que continue a aumentar como resultado de novas mutações, responsáveis por aproximadamente 10% dos casos diagnosticados (Falush, Almqvist, Brinkmann, Iwasa, & Hayden, 2001). Na América do Norte, Europa e Austrália a HD tem uma prevalência de 5,70 por 100 000 pessoas passando para apenas 0,40 por 100 000 pessoas na Ásia podendo esta diferença ser explicada pelos diferentes haplótipos dos genes envolvidos (Pringsheim et al., 2012).

3.3 DOENÇA DE PARKINSON

A DP é caracterizada pela degeneração de neurónios dopaminérgicos no sistema nigroestriado. A perda de dopamina resulta num tremor característico e incapacidade de controlar adequadamente o movimento. Os primeiros sintomas da doença, ocorrendo normalmente por volta dos 55 anos de idade, são os tremores unilaterais em repouso assim como a lentidão de movimentos simples (bradicinesia), incapacidade de locomoção (acinesia), rigidez dos membros, etc. A doença pode também causar depressão, alterações de personalidade, demência, perturbações do sono, perturbações da fala, e disfunção sexual (Haines, 2013; Mayeux, 2003).

A causa desta doença ainda não se encontra totalmente esclarecida, mas encontra-se associada a um conjunto de factores genéticos, tendo sido identificados vários genes que contribuem para o seu aparecimento, assim como ambientais (Agid, 1991; Huang, de la Fuente-Fernández, & Stoessl, 2003; Warner & Schapira, 2003). Apesar disto, a DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, depois da DA, afectando 1% da população mundial com mais de 65 anos de idade e cerca de 5% com mais de 80 anos (Behari, 1999). Na Europa, as prevalências variam desde 65,6/100 000 a 12500/100 000 (von Campenhausen et al., 2005) e em Portugal Continental, o Observatório Nacional de Saúde, em 2005, apresentou uma prevalência autodeclarada de 0,3% (Branco, Nogueira, & Contreiras, 2005).

Originalmente, o tratamento envolvia apenas a administração de levodopa (L-dopa), um precursor da dopamina. Este tratamento aumenta a síntese de dopamina mas, ao longo do tempo, vai perdendo eficácia. Hoje em dia, a terapêutica envolve a combinação de L-dopa com carbidopa, cujo objectivo é inibir o metabolismo periférico

da L-dopa. Uma vez que a carbidopa não consegue atravessar a barreira hemato-encefálica, o metabolismo da L-dopa é apenas diminuído nos tecidos periféricos e assim torna-se mais disponível no SNC aumentando também o seu efeito no alvo terapêutico (Haines, 2013; Mayeux, 2003).

3.4 ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

A ELA, também conhecida como doença de Charcot ou de Lou Gehric, é uma doença caracterizada pela degeneração e perda de neurónios motores no córtex cerebral, bulbo raquidiano, tronco cerebral e medula espinhal. Geralmente afecta pessoas entre 40 e 60 anos de idade com maior prevalência nos indivíduos de sexo masculino. Esta doença conduz ao enfraquecimento muscular e os sintomas iniciais podem incluir espasmos musculares, câibras ou rigidez, fraqueza muscular unilateral em que os doentes começam a sentir dificuldade em caminhar ou correr, fala arrastada ou dificuldade em mastigar ou engolir. Estes sintomas eventualmente conduzem à morte dentro de 5 anos após o aparecimento da patologia (Cleveland, 1999; S. U. Kim et al., 2013; Mayeux, 2003; Rowland & Shneider, 2001).

Embora as causas da ELA ainda não sejam totalmente conhecidas, é possível que seja causada pelo aumento do stress oxidativo, principalmente através de mutações no gene da enzima superóxido dismutase 1 (SOD1), provocando desorganização dos neurofilamentos, disfunção mitocondrial, agregação de proteínas e excitotoxicidade mediada por glutamato, e resultando eventualmente em apoptose celular (Rosen et al., 1993; Rowland & Shneider, 2001).

Em comparação com a DA e a DP, a ELA é rara. Na Europa ocorrem apenas cerca de 2.1 novos casos por 100 000 pessoas, não havendo dados concretos para Portugal. (Chiò et al., 2013; Logroscino et al., 2010).

Ainda não há um tratamento eficaz para a ELA mas o composto anti-excitotóxico riluzol actua ao nível dos terminais glutamatérgicos impedindo a libertação do glutamato e conseguindo assim aumentar a sobrevivência em cerca de 3 a 5 meses em humanos (Bensimon, Lacomblez, & Meininger, 1994; Carlesi et al., 2011; Chamberlain et al., 2008; Doble, 1996; Rosen et al., 1993).

4. NEUROGÊNESE *IN VITRO*

Devido à sua multipotência, capacidade de auto-renovação e diferenciação em neurónios, astrócitos e oligodendrócitos (McKay, 1997) a obtenção e o estudo das NSC *in vitro* tem todo o interesse pelas possíveis aplicações biomédicas daí resultantes.

As primeiras culturas neurais foram realizadas no início do século passado quando Harrison obteve neurónios migratórios a partir de culturas de células embrionárias de sapo (Harrison, 1907). Após terem sido inicialmente isoladas por Temple em 1989 a partir de SC do cérebro anterior do rato produzindo neurónios e células gliais em cultura (Temple, 1989) e a investigação para a obtenção das NSC a partir de células embrionárias (Lendahl, Zimmerman, & McKay, 1990) e SNC adulto (Reynolds & Weiss, 1992) ter arrancado, as NSC começaram a ser cultivadas *in vitro* em forma de agregados esféricos flutuantes em suspensão chamados “neuroesferas”, que se propagam por divisões simétricas originando novas NSC tendo também a capacidade de se diferenciar em neurónios, astrócitos e oligodendrócitos (Galli, Gritti, Bonfanti, & Vescovi, 2003; Reynolds, Tetzlaff, & Weiss, 1992; Reynolds & Weiss, 1992).

Apesar de culturas de neuroesferas terem sido fundamentais para o estudo das propriedades das NSC, elas representam um ambiente artificial bastante diferente do meio natural destas células, induzindo, assim, as NSC a agirem de maneira diferente do que *in vivo* (Gabay, Lowell, Rubin, & Anderson, 2003). Apesar disso, estas culturas são utilizadas para definir, por extrapolação, as propriedades das NSC *in vivo* (Marshall, Reynolds, & Laywell, 2007).

Independentemente das NSC terem o potencial de se diferenciar em neurónios e glia, é importante referir que nem todas as células que formam as neuroesferas são células estaminais. Somente 10% a 50% destas células são capazes de reter as características celulares de célula estaminal, enquanto as restantes são células que sofrem diferenciação espontânea. Por conseguinte, um neuroesfera é uma mistura de NSC, diferentes células progenitoras, e até mesmo neurónios e células gliais já diferenciadas, em número variável que depende do tamanho da neuroesfera e do tempo na cultura. Essa variabilidade deve-se à própria estrutura tridimensional que proporciona condições diferentes às células, por exemplo, no centro da neuroesfera, onde é mais provável ocorrer diferenciação. É por esta razão que as neuroesferas têm de ser sujeitas à dissociação mecânica e re-plaqueamento sob as mesmas condições de crescimento, isto é, baixa densidade celular (aproximadamente 5×10^4 células/cm²), ausência de soro, factores de crescimento adequados (factor de crescimento epidérmico (EGF) e/ou FGF) e na ausência de um

substrato forte adesão celular (poli-L-lisina ou poliornitina). Tal como na cultura primária, as células diferenciadas morrem rapidamente enquanto as NSC continuam a proliferar, dando origem a várias neuroesferas secundárias e crescimento exponencial *in vitro*. Deste modo, podem assim ser obtidas linhas celulares de NSC estáveis (Campos, 2004; Gritti, Galli, & Vescovi, 2001).

As culturas de neuroesferas têm, então, as suas limitações. Em primeiro lugar, como já foi referido, são heterogéneas, contendo não só NSC mas também neurónios e células da glia em diferentes estadios de diferenciação. Assim, as NSC dentro das neuroesferas não são directamente identificáveis se não forem purificadas e isso pode prejudicar ensaios analíticos neste tipo de culturas (Suslov, Kukekov, Ignatova, & Steindler, 2002), havendo também variação entre as próprias culturas o que pode originar diferentes resultados, ou mesmo resultados contraditórios, mediante diferentes laboratórios (Morshead, Benveniste, Iscove, & van der Kooy, 2002). Finalmente, as neuroesferas têm muito mais tendência a diferenciar-se em astrócitos do que neurónios tanto *in vivo* como *in vitro* (Conti et al., 2005; Fricker et al., 1999; Morshead et al., 2002).

Em oposição às culturas de neuroesferas, pode-se obter culturas de NSC em monocamada através da exposição ao FGF e ao factor de crescimento epidérmico (EGF), que permite a manutenção das células estaminais com capacidade para a neurogénese, auxiliando a auto-renovação das células e actuando como meio de supressão de apoptose. Estes dois factores inibem completamente a diferenciação em cultura aderente, por isso as NSC dividem-se apenas simetricamente, permitindo uma elevada auto-renovação e mantendo a capacidade de mais tarde se diferenciarem em neurónios, astrócitos e oligodendrócitos (Conti et al., 2005).

Tanto as neuroesferas como as culturas de NSC em monocamada são utilizadas para estudar as propriedades destas células *in vivo* (Cordey, Limacher, Kobel, Taylor, & Lutolf, 2008; Marshall et al., 2007) mas ainda não é certo se há efectivamente uma correlação entre ambas uma vez que tanto podem representar uma população real encontrada *in vivo* como podem ser o resultado de uma reprogramação *in vitro* “forçada” (Conti & Cattaneo, 2010).

4.1 FONTES DE CÉLULAS

As neuroesferas e as culturas de NSC em monocamada podem ser obtidas a partir das células ES, células estaminais pluripotentes induzidas (iPS) e das áreas germinativas

do cérebro fetal e adulto, ZSV e ZSG (Conti et al., 2005; Onorati et al., 2010; Pollard, Conti, Sun, Goffredo, & Smith, 2006; Weiss et al., 1996).

A utilização das células ES tem como vantagem a sua facilidade de obtenção a partir dos embriões (Evans & Kaufman, 1981) e de manter a sua capacidade ilimitada de diferenciação em todas as linhagens celulares (Keller, 1995; Nishikawa, Jakt, & Era, 2007; A. G. Smith, 2001; Thomson et al., 1998), tendo sido já demonstrada a capacidade das células ES de rato expressar propriedades neurais (Bain, Kitchens, Yao, Huettnner, & Gottlieb, 1995) e darem origem a células neuroepiteliais (Tropepe et al., 2001) e certos subtipos neuronais e gliais mais especializados, como os neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo (Fraichard et al., 1995; Kawasaki et al., 2000; J.-H. Kim et al., 2002), neurónios motores (Wichterle, Lieberam, Porter, & Jessell, 2002), e oligodendrócitos (Brüstle et al., 1999). As NSC de rato derivadas de células ES proliferam mais rapidamente do que as NSC somáticas e em monocamada e, para além disso, também se diferenciam nos tipos de células neurais com mais eficiência que as células somáticas, produzindo mais tipos de células assim demonstrando um potencial mais abrangente (Colombo et al., 2006). Outras vantagens são também a simplicidade de manutenção e expansão *in vitro* assim como a possibilidade de manipulação genética, permitindo então a criação artificial de diferentes linhagens celulares com marcadores específicos (Nishikawa et al., 2007; A. G. Smith, 2001) e, por fim, as culturas *in vitro* deste tipo de células facilmente atingem os 95% de pureza, crescendo em monocamada (Conti & Cattaneo, 2010). No entanto, entre as suas desvantagens encontra-se o facto de poderem formar teratocarcinomas devido à sua pluripotência (Stevens, 1970), o risco de rejeição após transplante e a necessidade de recorrer à imunossupressão (Guillaume & Zhang, 2008), assim como as questões éticas inerentes à obtenção e isolamento destas células, sobretudo no caso das células ES humanas (Jaenisch, 2004).

As células ES humanas (h-ESCs) depois de isoladas, mostraram possuir o potencial para originar todos os tipos de tecidos de células do corpo (Reubinoff, Pera, Fong, Trounson, & Bongso, 2000; Thomson et al., 1998), tendo sido desenvolvidas técnicas para ser possível diferenciá-las de forma eficiente *in vitro* em células neuronais progenitoras (Banda & Grabel, 2016; Carpenter et al., 2001; Kirkeby et al., 2012; Ozolek et al., 2010; Reubinoff et al., 2001; S.-C. Zhang, Wernig, Duncan, Brüstle, & Thomson, 2001) e subtipos neurais e gliais (Muffat et al., 2016; Nistor, Totoiu, Haque, Carpenter, & Keirstead, 2005; Piao et al., 2015; Sundberg, Skottman, Suuronen, & Narkilahti, 2010; Y. Yan et al., 2005). Esta fonte de células é um ponto de partida para a produção de

qualquer célula neural, e oferecem um modelo *in vitro* para a examinação dos mecanismos de indução neural e especificação de linhagens celulares ao longo do desenvolvimento humano precoce (Guillaume & Zhang, 2008). No entanto, tal como as células ES, há o problema da segurança que deriva da sua pluripotência, podendo originar células e tecidos indesejáveis ou até mesmo formação de teratomas e cuja solução passa, em ambos os casos, por direccionar as células para o destino neural (Ying, Stavridis, Griffiths, Li, & Smith, 2003; S.-C. Zhang, 2003), sendo que a eliminação das células indiferenciadas é também uma possível abordagem para aumentar o número de células específicas em cultura (S.-C. Zhang et al., 2001).

As iPS são um tipo de células descrito pela primeira vez por Takahashi e Yamanaka em 2006. Estes cientistas conseguiram pela primeira vez gerar células pluripotentes partindo directamente das próprias células dos doentes, resolvendo deste modo os problemas inerentes à utilização biomédica das células ES. Sabendo que as células somáticas podem ser reprogramadas através da transferência do conteúdo nuclear para oócitos anucleados (Gurdon, 1962; Wilmut, Schnieke, McWhir, Kind, & Campbell, 1997) ou a partir da sua fusão com células ES (Cowan, Atienza, Melton, & Eggan, 2005; Tada, Takahama, Abe, Nakatsuji, & Tada, 2001), eles supuseram que ovos não fertilizados e células ES continham factores que podiam ser capazes de induzir ou totipotência ou pluripotência a células somáticas. São vários os factores de transcrição que contribuem para a manutenção da pluripotência tanto nos embriões como em células ES em cultura, incluindo o OCT3/4 (Nichols et al., 1998; Niwa, Miyazaki, & Smith, 2000), Sox2 (Avilion et al., 2003) e Nanog (I. Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003), assim como o STAT3 (Matsuda et al., 1999; Niwa, Burdon, Chambers, & Smith, 1998), ERas (Takahashi, Mitsui, & Yamanaka, 2003), Myc (Cartwright et al., 2005), KLF4 (Y. Li et al., 2005) e β -catenina (Kielman et al., 2002). Takahashi e Yamanaka (2006) conseguiram demonstrar a indução de estado de pluripotência em células diferenciadas tais como fibroblastos adultos ou embrionários, através da expressão forçada de quatro factores: OCT3/4, Sox2, Myc, e KLF4. Um ano mais tarde, células iPS humanas foram obtidas com um conjunto de genes ligeiramente alterado: Oct4, Sox2, Nanog e Lin28 (Yu et al., 2007). Estas novas células, as iPS, apresentam morfologia, crescimento e expressão de genes marcadores característicos das células ES (Takahashi & Yamanaka, 2006). Um ponto positivo mais concreto para o tema desta monografia é o facto das células humanas iPS poderem originar estruturas neuronais com marcadores de expressão de neurónios

dopaminérgicos (Takahashi et al., 2007), o que as torna muito promissoras para a terapia das doenças neurodegenerativas.

Do seu lado, as células iPS partilham algumas das vantagens com as células ES, dado que partilham morfologia e modo de crescimento semelhantes. Estas células também conseguem diferenciar-se *in vitro* nas três camadas primárias germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme), as suas culturas *in vitro* atingem os 95% de pureza e o crescem igualmente em monocamada (Conti & Cattaneo, 2010; Medvedev, Shevchenko, & Zakian, 2010). Têm como benefícios adicionais o facto de serem específicas para o doente em questão, uma vez que foram retiradas do próprio e portanto não há grandes questões éticas associadas nem necessidade de imunossupressão (Medvedev et al., 2010; Wernig et al., 2007). No entanto, o problema da formação de teratocarcinomas mantém-se por causa dos factores utilizados para a obtenção destas células (Duinsbergen, Salvatori, Eriksson, & Mikkers, 2009; Okita, Ichisaka, & Yamanaka, 2007) e acrescenta-se o facto da reprogramação genética ser um processo longo e ineficiente assim como possível de gerar anomalias genéticas, principalmente se tiverem sido usados retrovírus (Medvedev et al., 2010; X. Zhao et al., 2009).

Se por um lado temos as células ES e iPS que são facilmente obtidas em grande quantidade, as células adultas provenientes da ZSV e ZSG encontram-se em número reduzido e são difíceis de expandir em laboratório (Murrell et al., 2013). São células multipotentes (Gritti et al., 1996) e, ao contrário das ES e iPS, já estão predeterminadas para destinos celulares específicos como o bulbo olfactório nos roedores já mencionado anteriormente. *In vitro*, crescem em neurosféricas e, por esta razão, a pureza das culturas é baixa (Conti & Cattaneo, 2010; Gritti et al., 1996; Reynolds & Weiss, 1992).

A reprogramação directa de fibroblastos humanos em células iPS levantou a questão na comunidade científica sobre a possível reprogramação directa destas células em neurónios, utilizando uma abordagem semelhante. Em 2010 chegou-se à conclusão que os fibroblastos têm também a capacidade de ser directamente reprogramados e convertidos em neurónios por expressão forçada de três factores de transcrição específicos da linhagem neural: Brn2, Ascl1 e Myt1l (Pang et al., 2011; Vierbuchen et al., 2010) ou através da expressão de Mash1, Ngn2, Sox2, Nurr1 e Pitx3 (Xinjian Liu et al., 2012) e, mais recentemente, apenas com o factor Ascl1 (Chanda et al., 2014). Estas células podem formar sinapses funcionais e integrar-se nas redes neuronais pré-existentes (Vierbuchen et al., 2010). Em 2011 foi demonstrado um novo método de obtenção de células neuronais induzidas através da utilização de microRNA (Yoo et al., 2011).

Estudos recentes demonstraram que, para além de fibroblastos, muitos outros tipos de células somáticas são capazes de serem convertidas em neurónios funcionais, como é o caso dos hepatócitos (Marro et al., 2011), gliomas nos quais há inibição da proliferação de tumores tanto *in vitro* como *in vivo* (J. Zhao et al., 2012), adipócitos (Y. Yang et al., 2013), células hematopoiéticas (Castaño et al., 2014) ou mesmo a partir das células de urina, um método não invasivo (S.-Z. Zhang et al., 2016). Recentemente tem sido demonstrada também a indução directa de certos tipos de neurónios através da reprogramação de fibroblastos (Blanchard et al., 2015; Colasante et al., 2015; Z. Shi et al., 2016; Son et al., 2011; Vadodaria et al., 2016).

4.2 DIFERENCIAÇÃO NEURAL *IN VITRO*

A diferenciação neural *in vitro* é dificilmente controlada devido à grande complexidade dos componentes do SNC e a dificuldade de reproduzir as condições necessárias em laboratório (A. G. Smith, 2001) e existem vários protocolos, produzindo resultados variáveis e heterogéneos que tentam mimetizar as diferentes fases do desenvolvimento neuronal no embrião, desde a indução neural até a diferenciação final em neurónios e células gliais.

Como as células ES são pluripotentes e facilmente se diferenciam nas várias linhagens de células (Bradley, Evans, Kaufman, & Robertson, 1984; Gossler, Joyner, Rossant, & Skarnes, 1989), a eficácia de conversão neural é limitada e normalmente é necessário seleccionar a linhagem pretendida para assegurar a homogeneidade da população de células pretendida (M. Li, Pevny, Lovell-Badge, & Smith, 1998). A formação de populações neurais a partir de células ES foi inicialmente conseguida através da formação de corpos embrióides (EB) na presença de RA (Bain et al., 1995) e, mais tarde, foi demonstrada também a possibilidade da utilização de meios selectivos (Okabe, Forsberg-Nilsson, Spiro, Segal, & McKay, 1996), de factores de crescimento em agregados multicelulares na ausência de soro (Wiles & Johansson, 1999), ou em cultura em suspensão, apesar de nesta a sua eficácia ser bastante baixa, rondando entre os 0,1 e 0,2% (Trobepe et al., 2001).

Em 2001 Zhang et al. demonstraram a formação de rosetas neurais com características semelhantes ao tubo neural embrionário a partir de EBs na presença de FGF2 (S.-C. Zhang et al., 2001). Em 2003 Ying e os colegas descobriram um método simples sem soro para chegar ao compromisso neuronal através da cultura de células em

monocamada e com FGF, na qual a eliminação de certos sinais indutivos para destinos alternativos, como é o caso do BMP, é suficiente para que as células se transformem em precursores neurais (Ying et al., 2003).

Seguindo as passadas dos dois estudos anteriores, em 2005 Watanabe et al. utilizaram uma combinação das duas técnicas estabeleceram o método de cultura de EBs em meio isento de soro (SFEB), obtendo precursores neurais do cérebro anterior com a adição de indutores neurais específicos, como o Wtn e o Shh (Watanabe et al., 2005). Elkabetz et al. basearam-se no método anterior e surgiu assim o método SFEBq que permite a formação de rosetas ainda maiores e bastante alongadas com uma arquitectura apicobasal, e baseia-se na utilização de FGF, Shh, ácido ascórbico e factor neurotrófico cerebral (BDNF) em adição ao SFEB (Elkabetz et al., 2008). A aplicação deste método permitiu o desenvolvimento tridimensional de certas regiões do cérebro tais como a adenohipófise (Ozone et al., 2016; Suga et al., 2011), retina (Eiraku et al., 2011; Nakano et al., 2012), cerebelo (Muguruma, Nishiyama, Kawakami, Hashimoto, & Sasai, 2015), cérebro anterior (Kadoshima et al., 2013) e hipocampo (Sakaguchi et al., 2015). A aplicação deste método na diferenciação das células iPS possibilita o estudo de patologias neurológicas humanas (Mariani et al., 2012), tendo sido já utilizado para estudar as alterações observadas durante o desenvolvimento que levam ao autismo (Mariani et al., 2015).

Apesar dos progressos significativos com os métodos SFEB e SFEBq, a eficiência da diferenciação ainda deixava muito a desejar, situando-se à volta dos 35% (Watanabe et al., 2005). Chambers e os colegas criaram uma abordagem eficiente para a produção de rosetas neurais directamente a partir de h-ESC através da inibição dupla da sinalização SMAD, efectores a jusante dos TGF (Muñoz-Sanjuán & Brivanlou, 2002), conseguindo deste modo atingir os 80% de diferenciação (S. M. Chambers et al., 2009). Através da adição de RA é possível aumentar ainda mais a eficiência de diferenciação (95%) a partir de células h-ESC e iPS (Y. Shi, Kirwan, Smith, Robinson, & Livesey, 2012).

Sato et al. revolucionaram o campo da formação de estruturas tridimensionais com a utilização do matrigel, um gel matriz de suporte extracelular que fornece o contexto ideal para as células se auto-organizarem em estrutura tridimensional, para a formação de epitélio intestinal (Sato et al., 2009). A incorporação de culturas em matrigel juntamente com SFEBq foi rapidamente aplicada para a formação de organóides cerebrais, formando um tecido heterogéneo com uma variedade de identidades regionais e atingido o tamanho máximo após 2 meses e podendo sobreviver indefinidamente (actualmente até 10 meses)

quando mantidos em bioreactor giratório (Kadoshima et al., 2013; Lancaster et al., 2013; Zhu et al., 2013). Recentemente, a combinação do método de inibição dupla SMAD com o SFEB mostrou capacidade para gerar tecidos com identidades neurais e gliais do córtex dorsal num contexto tridimensional (Paşca et al., 2015) e a utilização da inibição dupla SMAD com a incorporação em matrigel, juntamente com agitação permitiu a Qian et al. estudarem os efeitos do vírus Zika no cérebro anterior. Estes cientistas utilizaram um mini bioreactor que permitiu a redução dos custos, o aumento da produtividade e uma sobrevivência celular melhorada podendo obter-se condições de cultura e potenciais culturas de tecidos tridimensionais em larga escala (Qian et al., 2016).

Cada um dos métodos descritos, para além das suas muitas vantagens tem também certas limitações sendo então necessário considerar as diversas variáveis em questão, tais como a técnica e a escala de tempo necessárias para o método particular assim como a especificação biológica necessária para o objectivo em estudo. Em primeiro lugar, embora as três abordagens sejam exequíveis na maior parte dos laboratórios de cultura de tecidos, algumas requerem equipamento especializado ou condições de cultura complicadas. O primeiro grande obstáculo, o de estabelecer a cultura de células humanas como uma prática de rotina, foi ultrapassado com o aparecimento de protocolos sem alimentação tornaram o processo muito menos trabalhoso (Chen, Mallon, McKay, & Robey, 2014; Ludwig et al., 2006). As rosetas podem ser cultivadas no equipamento padrão com uma boa técnica de cultura estéril, tendo protocolos simples e com alta eficiência (S. M. Chambers et al., 2009; Y. Shi et al., 2012). As culturas tridimensionais, devido à sua complexidade, requerem também técnicas mais especializadas como um meio rico em oxigénio (Eiraku et al., 2008; Kadoshima et al., 2013; Sakaguchi et al., 2015) ou agitação (Lancaster et al., 2013; Qian et al., 2016). Em segundo lugar, os tecidos neurais podem ser obtidos muito mais rapidamente com células de rato do que com células humanas, isto é, enquanto que é possível obter células neuroepiteliais em cerca de 4 ou 5 dias (Eiraku et al., 2008) e neurónios 5 dias após a diferenciação (Ying et al., 2003) quando se usa células de rato, a diferenciação das células humanas para células neuroepiteliais demora entre 7 a 10 dias (S. M. Chambers et al., 2009; S.-C. Zhang et al., 2001) e 20 dias para o aparecimento de neurónios (Lancaster & Knoblich, 2014; Y. Shi et al., 2012). Por fim, o resultado final dos diferentes métodos têm complexidade e heterogeneidade distintas, encontrando-se as NSC no espectro mais homogéneo mas menos complexo (Pollard et al., 2006), sendo especialmente úteis para experimentação científica com o objectivo de encontrar novos fármacos (Garavaglia et al., 2010), e os

organóides cerebrais no espectro oposto, sendo tipicamente utilizados para testar hipóteses específicas onde é necessária a análise morfológica (Cugola et al., 2016; Dang et al., 2016; Mariani et al., 2015; Qian et al., 2016) e, portanto, requerem uma representação mais precisa do tecido.

5. APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Uma vez que as doenças neurodegenerativas ocorrem por perda ou degeneração progressiva dos neurónios e células gliais presentes no SNC e por lesões na medula espinhal por trauma, a neurogénese *in vitro* oferece uma possível solução para a recuperação destas células. Dada a correlação existente entre o aparecimento de doenças neurodegenerativas e o envelhecimento da população, é necessário encontrar terapias rápidas, eficazes e seguras para estas doenças. Neste momento, já há alguns bancos de células que permitem que a comunidade científica tire proveito dos sistemas de células ES e iPS para estudar as doenças neurodegenerativas (Wray et al., 2012).

Há dois principais desafios quando se trata de investigar terapias para estas doenças. Por um lado, existem diferenças entre a espécie humana, para a qual queremos obter a terapia, e as espécies utilizadas nos ensaios sendo estas incapazes de mimetizar todos os aspectos da patologia no ser humano (Y. H. Kim et al., 2015). Por outro lado, os neurónios podem ter aparência, desenvolvimento, comportamento e complexidade diferente na cultura bidimensional e *in vivo*. Para contornar este último problema, recentemente tem-se incorporado células ES e iPS em hidrogel ou matrigel, criando sistemas de cultura tridimensional (Paşca et al., 2015; Puschmann et al., 2013; Schwartz et al., 2015; I. Smith et al., 2015) para mais facilmente se estudar as doenças neurodegenerativas, como a DA (Choi et al., 2014; Y. H. Kim et al., 2015). No entanto, estas estruturas ainda não mimetizam completamente a complexidade do sistema cerebral *in vivo* que incluem componentes que grande relevância durante a patologia e o tratamento, como a barreira hematoencefálica, a vascularização e a resposta imune. Assim, o interesse na criação de vascularização (Samuel et al., 2013; Takebe et al., 2013) ou da barreira hematoencefálica a partir de células iPS tem crescido na comunidade científica (Lippmann et al., 2012; Lippmann, Al-Ahmad, Azarin, Palecek, & Shusta, 2014; Lippmann, Al-Ahmad, Palecek, & Shusta, 2013; Minami et al., 2015).

5.1 APLICAÇÕES NA DA

Tem sido demonstrado que o transplante de NSC se correlaciona com uma melhoria da função cognitiva em animais com DA ocorrendo um aumento da densidade sináptica do hipocampo mediada pelo BDNF (Blurton-Jones et al., 2009; Xuan et al., 2008).

Como a DA se caracteriza por depósitos de placas de proteína β -amilóide e formação de emaranhados neurofibrilares, as terapêuticas mencionadas previamente passam pela sua redução com recurso às proteinases. A utilização de fibroblastos e iPS geneticamente modificados para introduzir os genes destas proteinases no cérebro tem sido estudada nestes últimos anos (Hemming et al., 2007; Takamatsu et al., 2014). Por outro lado, como ocorre uma redução significativa da actividade da acetilcolina-transferase, responsável pela acetilcolina, a utilização de NSC com sobre-expressão do gene da acetilcolina-transferase é uma outra possível abordagem, uma vez que já foi provado que contribui para a melhoria da função cognitiva nos ratos que sofreram este tipo de transplante (Park, Joo, et al., 2012; Park, Lee, et al., 2012).

Outra opção terapêutica é a introdução do factor de crescimento nervoso (NGF) que, entre outras funções, previne a morte neuronal e a toxicidade amilóide e pode por isso ser utilizado para o tratamento de degeneração neuronal e morte celular na DA (Fischer et al., 1987; Hefti, 1986), apesar dos efeitos tóxicos reportados quando administrado por infusão ou injeção intracerebroventricular (Isaacson, Saffran, & Crutcher, 1990; Schlachetzki, Pizzo, Morrisette, & Winkler, 2014; Williams, 1991). No entanto, isto tem que ser feito através de terapia *ex vivo* uma vez que o NGF é demasiado grande e polar e não atravessa a barreira hematoencefálica. Deste modo, a utilização de SC geneticamente modificadas pode diminuir ou impedir a perda de células colinérgicas uma vez que as SC podem ser geneticamente modificadas para transportar o gene NGF e têm uma alta capacidade migratória após o transplante cerebral (S. U. Kim, 2004; Tuszynski, 2002).

Recentemente as células iPS têm sido utilizadas para servir de modelo para os fenótipos da doença, permitindo um estudo da mesma e das suas características *in vitro*. Como exemplo, em 2011 Yagi e os seus colegas utilizaram fibroblastos com mutações na PS1 ou PS2 e, através duma mistura de cinco factores de reprogramação (Oct4, Sox2, Klf4, Lin28 e Nanog), criaram células iPS que depois foram diferenciadas em células neuronais. Assim, esta equipa conseguiu demonstrar que o desenvolvimento de neurónios com as mutações não se altera face ao controlo, embora se registre um aumento da secreção de proteína β -amilóide face ao mesmo (Yagi et al., 2011). Estudos semelhantes seguiram-se a partir daí, comparando iPS obtidas através de fibroblastos de doentes com DA esporádica, DA hereditária e doentes saudáveis revelando as diferenças de secreção da proteína nestes grupos (Israel et al., 2012; Kondo et al., 2013) ou mesmo outros estudos têm demonstrado o efeito de mutações em cultura tridimensional, conseguindo associar

as duas principais características da patologia, ou seja, a deposição de placas de proteína β -amilóide e formação de emaranhados neurofibrilares, a NSC humanas (Choi et al., 2014; Y. H. Kim et al., 2015).

5.2 APLICAÇÕES NA DH

A cultura de células ES e iPS que contem a mutação causadora da DH permite um melhor estudo dos mecanismos da doença num ambiente controlado. Tal como na DA, vários estudos confirmaram o efeito da mutação HTT em ratos, contribuindo para definir o fenótipo típico das células geradas depois de diferenciadas como, por exemplo, actividade lipossómica aumentada, alterações de expressão de proteínas e aumento de apoptose (Camnasio et al., 2012; Chae et al., 2012; Jeon et al., 2012; The HD iPSC Consortium, 2012). Para além da sua utilidade no estudo de mecanismos da doença, os modelos de cultura de células ES e iPS também são instrumentos importantes para o desenvolvimento e validação de abordagens terapêuticas (Hargus, Ehrlich, Hallmann, & Kuhlmann, 2014), uma vez que, como já referido, a terapêutica da DH é apenas paliativa de momento. Uma das recentes descobertas é a utilização de uma nova molécula, a X5050, que em NSC derivadas de iPS humanas promove a expressão do gene BDNF, alterada na HTT (Gauthier et al., 2004), através da degradação do factor de transcrição do elemento silenciador 1, inicialmente descrito como um inibidor de genes neuronais em células não-neuronais (Cheng et al., 1996) e igualmente envolvido na manutenção e diferenciação das NSC (Charbord et al., 2013; Singh, Kagalwala, Parker-Thornburg, Adams, & Majumder, 2008).

Uma vez que a DH é causada pela mutação do gene HTT e caracteriza-se principalmente pela perda de neurónios do corpo estriado, o transplante de NSC para substituir neurónios degenerados é uma possível terapia (Björklund & Lindvall, 2000). As iPS dos próprios doentes representam uma opção atractiva para a regeneração celular personalizada uma vez que não seria necessária imunoterapia (Shtrichman, Germanguz, & Itskovitz-Eldor, 2013). No entanto, dado que estas iPS teriam a mutação da HTT, os neurónios derivados destas células também tenderiam a degenerar e portanto esta abordagem teria de ser efectuada após uma correcção genética como já foi feito inicialmente em 2012 (An et al., 2012; Qin & Gao, 2016).

Já há estudos que incluem o transplante de células neurais fetais em doentes com DH (Bachoud-Lévi et al., 2000; Gallina et al., 2008; Hauser et al., 2002; Rosser et al.,

2002) mas isto levanta preocupações éticas tanto a nível do dador como do doente em questão (Boer, 1999) e portanto, uma alternativa viável é a utilização de NSC e células ES. O estudo de El-Akabawy et al. (2012) demonstrou que apesar das NSC terem o potencial de serem transplantadas para o corpo estriado dos doentes com HD, em ratos a sobrevivência das células transplantadas era baixa, quer na forma indiferenciada ou pré-diferenciadas (El-Akabawy et al., 2012). Por outro lado, precursores neurais diferenciados a partir de células ES demonstraram uma sobrevivência ao longo de 6 meses em ratos, formando sinapses e estruturas pós-sinápticas sem, no entanto, ocorrer a formação de teratomas (Nasonkin et al., 2009). Aubry et al. (2008) transplantaram células neurais derivadas de células ES em diferentes fases, desde rosetas precursoras neurais a neurónios GABAérgicos do corpo estriado, reportando que células transplantadas nas primeiras fases de diferenciação demonstraram uma forte propensão para desenvolver teratocarcinomas enquanto que as células transplantadas mais maduras mostraram uma sobrevivência mais baixa, sendo os melhores resultados obtidos quando as células foram expostas aos factores Shh e DKK1 e BDNF (Aubry et al., 2008). Carri et al conseguiram também transplantar células derivadas de células ES expostas a Shh e DKK1 (Carri et al., 2012) com um protocolo semelhante a Ma et al. que transplantaram precursores neurais GABAérgicos em ratos, corrigindo com sucesso os problemas motores dos mesmos (Ma et al., 2012). Apesar de estes estudos parecem promissores, um estudo mais recente de Arber et al. com recurso à activina e Shh para a diferenciação das células em células neuronais do corpo estriado não demonstrou qualquer melhoria motora nos ratos (Arber et al., 2015) pelo que é necessário mais investigação neste campo de maneira a se obter um protocolo simples que origine células capazes de formar ligações no corpo estriado sem a produção de teratocarcinomas.

5.3 APLICAÇÕES NA DP

Sendo uma das doenças neurodegenerativas mais comuns, a formação de neurónios dopaminérgicos é, por isso, um dos temas mais estudados pelos cientistas nesta área.

Desde o final dos anos 1980 que o transplante de neurónios dopaminérgicos obtidos de tecidos fetais humanos no corpo estriado de doentes com DP tem sido utilizado como terapia de forma bem sucedida em doentes com doença em estado avançado (Kordower, Goetz, Freeman, & Olanow, 1997; Lindvall et al., 1990, 1992; Peschanski et

al., 1994). Nos casos mais bem sucedidos, os doentes foram capazes de reduzir ou mesmo remover o tratamento com L-dopa durante vários anos após o transplante (Hagell et al., 1999; Piccini et al., 1999; Wenning et al., 1997). No entanto, este tipo de transplante está associado, mais uma vez, aos problemas relacionados com questões éticas e religiosas como por exemplo a necessidade de obtenção dos tecidos fetais. Além disso, a sobrevivência de células fetais transplantadas no cérebro dos doentes era muito baixa e era difícil obter tecidos fetais suficientes necessários para o transplante (Hagell & Brundin, 2001). Para além disso, estudos demonstraram que o efeito placebo podia estar presente (Freed et al., 2001; Olanow et al., 2003).

Deste modo, a utilização de neurónios dopaminérgicos gerados a partir de células ES, iPS, ou NSC pode servir como uma alternativa prática e eficaz uma vez que tem sido possível obter neurónios dopaminérgicos activos a partir de células ES humanas e de rato com a ajuda de FGF e Shh (J.-H. Kim et al., 2002; Perrier et al., 2004; Y. Yan et al., 2005), células iPS (Wernig et al., 2008), em co-cultura com células do estroma (Kawasaki et al., 2000; Schulz et al., 2004) e mesmo NSC da ZSV (Shim et al., 2007). Estas células contribuem para uma recuperação locomotora no rato 5 meses após o transplante (Roy et al., 2006; D. Yang, Zhang, Oldenburg, Ayala, & Zhang, 2008), facto confirmado através testes de ressonância magnética e análise de imagem que demonstrou que os neurónios dopaminérgicos derivados de células humanas ES são equivalentes em termos de benefícios quando comparados com os neurónios dopaminérgicos derivados do tecido fetal (Grealish et al., 2014). Um dos problemas da utilização das células ES é, como já referido, a formação de teratocarcinomas (Roy et al., 2006) e como os doentes com DP têm expectativa de vida normal este é um factor problemático na sua aplicação clínica. A utilização de NSC também já demonstrou a sua eficácia em transplantes no rato (Yasuhara et al., 2006) e no macaco em co-cultura e posteriormente com FGF, EGD e LIF (Takagi et al., 2005).

Neurónios dopaminérgicos humanos derivados de células iPS poderiam proporcionar uma fonte ideal para a terapia celular na DP, uma vez que podem ser obtidos a partir de fibroblastos dos próprios doentes sem causar rejeição imunológica. Wernig et al. demonstraram a melhoria do comportamento dos ratos após o transplante de neurónios dopaminérgicos derivados de células iPS (Wernig et al., 2008).

As culturas de neurónios dopaminérgicos obtidas através de células ES ou iPS podem conter as células indiferenciadas passíveis de causar a formação de tumores e limitar a sua aplicação clínica por isso a obtenção de neurónios dopaminérgicos

directamente através da reprogramação de fibroblastos é uma das abordagens mais recentes, sendo possível obter estas células com sucesso combinando diferentes factores de transcrição como Mash1 (Ascl1), Nurr1 (Nr4a2), Lmx1a, NGN2, Sox2 e Pitx3 (Caiazzo et al., 2011; H.-S. Kim, Kim, Jo, Jeon, & Cho, 2014; Xinjian Liu et al., 2012), já havendo provas que este transplante funciona em ratos (J. Kim et al., 2011).

5.4 APLICAÇÕES NA ELA

A ELA é uma doença associada com a perda de neurónios motores. Os neurónios motores podem ser obtidos de células neuroectodermas derivadas de células ES humanas de um modo semelhante às da DP. Como já mencionado, de momento não existe um tratamento eficaz para doentes que sofrem de ELA, mas há estudos que têm demonstrado que é possível obter neurónios motores através de células ES, iPS e NSC através da exposição ao RA e Shh, por exemplo (Dimos et al., 2008; Harper et al., 2004; X.-J. Li et al., 2005; Miles et al., 2004; Wichterle et al., 2002). Neurónios motores derivados de células ES de rato, quando transplantados, sobreviveram e formaram sinapses funcionais (H. Lee et al., 2007; Miles et al., 2004), melhorando mesmo a função motora (Kerr et al., 2003).

O transplante de NSC isoladas a partir de células da medula espinhal fetal atrasou a progressão da doença de maneira eficaz num modelo de rato de ELA (Xu et al., 2006) apesar de haver um outro estudo em que o aparecimento da doença nos animais transplantados foi semelhante ao controlo não tratado e a sobrevivência global dos animais também não foi afectada (Hefferan et al., 2012). Há também um estudo que comprova a eficácia destas células em doentes humanos (Glass et al., 2012).

Mais uma vez, os neurónios motores derivados de células iPS isoladas de doentes com ELA resolvem muitos problemas imunológicos e éticos podendo ser uma fonte celular ideal para o rastreio de moléculas candidatas a novas terapias (Dimos et al., 2008).

Outra possível linha terapêutica é a utilização do factor de crescimento celular endotelial vascular (VEGF) que retarda significativamente o início da doença e prolonga a sobrevivência de modelos animais com ELA (Storkebaum et al., 2005; Zheng, Nennesmo, Fadeel, & Henter, 2004). Assim, foi demonstrado que o transplante de NSC com sobre-expressão deste factor em ratos induziu uma melhora funcional, atrasando o início da doença e prolongando a sobrevivência dos animais (Hwang et al., 2009).

5.5 OUTRAS APLICAÇÕES

Sendo células pluripotentes, as aplicações destas células são muito variadas.

A esclerose múltipla é causada pela destruição dos oligodendrócitos e perda da mielina por um mecanismo auto-inflamatório (McFarlin & McFarland, 1982) e, para além das opções terapêuticas que envolvem células fetais (Gumpel et al., 1987; Windrem et al., 2004), é possível obter oligodendrócitos para transplante a partir de células ES (Brüstle et al., 1999; Glaser, Perez-Bouza, Klein, & Brüstle, 2005; Keirstead et al., 2005; S. Liu et al., 2000) e NSC (Coprav et al., 2006; R. C. Rao, Boyd, Padmanabhan, Chenoweth, & McKay, 2009; Yandava, Billingham, & Snyder, 1999) com recurso a factores como o Olig1 e Olig2.

Os dois tipos principais de acidente vascular cerebral são o enfarte cerebral (isquemia) e hemorragia intracerebral. Este último provoca um défice neurológico grave e, portanto, a terapia celular baseada em células estaminais é uma possível abordagem a considerar (Gebel & Broderick, 2000), já havendo estudos demonstrando as vantagens deste tipo de transplante. Em modelos animais de acidente vascular cerebral, as NSC humanas transplantadas migraram selectivamente para os locais danificados, diferenciando-se em neurónios e astrócitos, promovendo assim a recuperação destes animais apesar da sobrevivência das células transplantadas ainda não ser muito alta (Chu et al., 2004; Chu, Kim, Jeong, Kim, & Yoon, 2003; Jeong et al., 2003; Kelly et al., 2004; H. J. Lee et al., 2007), podendo este facto ser contornado, por exemplo, pela expressão da proteína Akt1 como foi demonstrado em 2009 (H. J. Lee, Kim, Kim, & Kim, 2009). As NSC transplantadas por via intravenosa 3 dias após o acidente vascular cerebral em ratos demonstraram ser capazes de diminuir a inflamação e a formação de cicatrizes gliais e promover a neuroprotecção retardada, melhorando a recuperação (Bacigaluppi et al., 2009).

Traumatismos na medula espinhal resultam na perda de neurónios e células gliais, inflamação, formação de cicatriz e desmielinização e por isso a formação de novos neurónios nessa zona é essencial. Desde a demonstração que o transplante de células ES promove uma recuperação funcional, em 1999 (McDonald et al., 1999), têm sido vários os estudos seguintes a demonstrar resultados semelhantes usando vários tipos de células como por exemplo, o trabalho de Cummings et al que demonstrou a indução da recuperação motora através do transplante de neurónios e oligodendrócitos a partir das NSC ou o estudo de Yan et al. que, ao transplantarem NSC humanas em medulas espinhais de ratos traumatizados, obtiveram a formação de axónios e sinapses com os

neurónios motores presentes (Cummings et al., 2005; Iwanami et al., 2005; Karimi-Abdolrezaee, Eftekharpour, Wang, Morshead, & Fehlings, 2006; Keirstead et al., 2005; Teng et al., 2002; J. Yan et al., 2007). O transplante de NSC humanas com sobre-expressão do VEGF aumentou a proliferação das células progenitoras gliais e o número de oligodendrócitos promovendo assim a recuperação (H. M. Kim, Hwang, Lee, Kim, & Kim, 2009). Este tipo de abordagem já é utilizada hoje em dia com resultados positivos (Moviglia et al., 2009).

Há evidência de que as NSC migram de encontro aos tumores cerebrais, apesar do mecanismo ainda não ser bem conhecido mas supõe-se que as quimiocinas e os factores de crescimento pró-angiogénicos produzidos no microambiente tumoral possam actuar como quimioatractores para as NSC (Imitola et al., 2004) e, portanto, estas células podem ser utilizadas para a terapia anticancerígena (Aboody et al., 2000; Danks et al., 2007; Ehtesham, Kabos, Gutierrez, et al., 2002; Gutova et al., 2010; Joo et al., 2009; Seol et al., 2011; D. Zhao et al., 2012). Combinando a terapia celular com a terapia génica do gene PEX, foi possível reduzir o tamanho do tumor até 90% (S.-K. Kim et al., 2005). Uma das abordagens é a utilização de um sistema onde as NSC são modificadas para expressar certos genes que codificam para algumas enzimas que podem converter um profármaco inactivo administrado sistemicamente em metabolitos tóxicos no local do tumor. Exemplos deste tipo de terapia são a utilização da timidina cinase do vírus de herpes com o profármaco ganciclovir (S. Li et al., 2005; Y. Zhao & Wang, 2010) ou a aplicação do gene da citosina-desaminase que converte o profármaco inactivo 5-fluorocitosina em 5-fluorouracilo (Aboody et al., 2000, 2006). Outra opção terapêutica é a manipulação das NSC de modo a expressarem genes imunomoduladores que actuam como agentes anticancerígenos como a interleucina-4 (Benedetti et al., 2000), interleucina-12 (Ehtesham, Kabos, Kabosova, et al., 2002), interleucina-23 (Yuan, Hu, Belladonna, Black, & Yu, 2006) e interferão β (D.-H. Lee et al., 2009).

Como já foi referido, a formação de estruturas tridimensionais a partir de SC também já é uma realidade possível (Eiraku et al., 2008; Nasu et al., 2012; Qian et al., 2016), principalmente no desenvolvimento da retina neural (Eiraku et al., 2011; Nakano et al., 2012) e para o estudo do autismo (Mariani et al., 2015), assim como a utilização de modelos das doenças neurodegenerativas, como a DA, abrindo possibilidades de estudar novas estratégias terapêuticas (H.-K. Lee et al., 2016), modelos para estudar a neurotoxicidade de substâncias (Sandström et al., 2016) e mais recentemente para o

estudo do efeito do vírus Zika na microcefalia (Cugola et al., 2016; Dang et al., 2016; Garcez et al., 2016; Qian et al., 2016).

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Antes da utilização corriqueira das NSC como terapia em seres humanos é necessário aprofundar algumas questões tais como o tipo de células mais adequado para a terapia de substituição celular em doentes com distúrbios neurológicos ou lesões cerebrais ou da medula espinhal, uma vez que podem ser obtidas através de células ES, iPS e da ZSV e ZSG do cérebro adulto. Uma vez que a utilização de células ES é controversa devido às questões éticas, religiosas e morais associadas é possível que o futuro destas terapias caminhe para a utilização exclusiva de células iPS que não só não têm essas questões associadas como evitam a utilização de terapia imunossupressora.

É também necessário arranjar mecanismos de forma a diminuir as preocupações associadas ao potencial teratocarcinogénico após a transplantação das NSC e este é um factor contornável através da diferenciação mais eficiente das células em cultura ou da utilização de métodos mais sensíveis para a purificação das células.

Já estão a ser dados passos para a utilização das NSC a larga escala com recurso a bioreactores e o objectivo do futuro é utilizar e aprimorar a tecnologia para reproduzir fielmente *in vitro* o cérebro humano *in vivo*.

Independentemente dos problemas ainda associados é inegável que as NSC têm um potencial terapêutico enorme, podendo levar ao desenvolvimento de novas terapias radicais de várias doenças neurodegenerativas e não só as que actualmente carecem de tratamentos eficazes. O próximo passo é, então, aplicar os estudos *in vitro* e *in vivo* já efectuados em doentes humanos.

BIBLIOGRAFIA

- Aboody, K. S., Brown, A., Rainov, N. G., Bower, K. A., Liu, S., Yang, W., ... Snyder, E. Y. (2000). Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), 12846–51. doi: 10.1073/pnas.97.23.12846
- Aboody, K. S., Najbauer, J., Schmidt, N. O., Yang, W., Wu, J. K., Zhuge, Y., ... Perides, G. (2006). Targeting of melanoma brain metastases using engineered neural stem/progenitor cells. *Neuro-Oncology*, 8(2), 119–26. doi: 10.1215/15228517-2005-012
- Agid, Y. (1991). Parkinson's disease: pathophysiology. *The Lancet*, 337(8753), 1321–1324. doi: 10.1016/0140-6736(91)92989-F
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis: Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 137(4), 433–57. doi: 10.1002/cne.901370404
- An, M. C., Zhang, N., Scott, G., Montoro, D., Wittkop, T., Mooney, S., ... Ellerby, L. M. (2012). Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 11(2), 253–63. doi: 10.1016/j.stem.2012.04.026
- Arber, C., Precious, S. V., Cambray, S., Risner-Janiczek, J. R., Kelly, C., Noakes, Z., ... Li, M. (2015). Activin A directs striatal projection neuron differentiation of human pluripotent stem cells. *Development*, 142(7), 1375–86. doi: 10.1242/dev.117093
- Aubry, L., Bugi, A., Lefort, N., Rousseau, F., Peschanski, M., & Perrier, A. L. (2008). Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), 16707–12. doi: 10.1073/pnas.0808488105
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development*, 17(1), 126–40. doi: 10.1101/gad.224503
- Bachoud-Lévi, A. C., Rémy, P., Nguyen, J. P., Brugières, P., Lefaucheur, J. P., Bourdet, C., ... al., et. (2000). Motor and cognitive improvements in patients with

- Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet*, 356(9246), 1975–9. doi: 10.1016/S0140-6736(00)03310-9
- Bacigaluppi, M., Pluchino, S., Peruzzotti-Jametti, L., Jametti, L. P., Kilic, E., Kilic, U., ... Hermann, D. M. (2009). Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. *Brain*, 132(Pt 8), 2239–51. doi: 10.1093/brain/awp174
- Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J. E., & Gottlieb, D. I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Developmental Biology*, 168(2), 342–357. doi: 10.1006/dbio.1995.1085
- Banda, E., & Grabel, L. (2016). Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Neural Progenitors. *Methods in Molecular Biology*, 1307, 289–98. doi: 10.1007/7651_2014_67
- Bayer, S. A., Yackel, J. W., & Puri, P. S. (1982). Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science*, 216(4548), 890–2. doi: 10.1126/science.7079742
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2015). *Neuroscience: exploring the brain* (4^a). Wolters Kluwer.
- Becker, T., & Becker, C. G. (2014). Axonal regeneration in zebrafish. *Current Opinion in Neurobiology*, 27, 186–191. doi: 10.1016/j.conb.2014.03.019
- Behari, M. (1999). Treatment of Parkinson's disease: fighting the surging enemy. *Neurology India*, 47(4), 259–62.
- Belluzzi, O., Benedusi, M., Ackman, J., & LoTurco, J. J. (2003). Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience*, 23(32), 10411–8.
- Benedetti, S., Pirola, B., Pollo, B., Magrassi, L., Bruzzone, M. G., Rigamonti, D., ... Finocchiaro, G. (2000). Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nature Medicine*, 6(4), 447–50. doi: 10.1038/74710
- Bensimon, G., Lacomblez, L., & Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 330(9), 585–91. doi: 10.1056/NEJM199403033300901
- Björklund, A., & Lindvall, O. (2000). Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nature Neuroscience*, 3(6), 537–44. doi: 10.1038/75705
- Blanchard, J. W., Eade, K. T., Szűcs, A., Lo Sardo, V., Tsunemoto, R. K., Williams, D., ... Baldwin, K. K. (2015). Selective conversion of fibroblasts into peripheral sensory

- neurons. *Nature Neuroscience*, 18(1), 25–35. doi: 10.1038/nn.3887
- Blurton-Jones, M., Kitazawa, M., Martinez-Coria, H., Castello, N. A., Müller, F.-J., Loring, J. F., ... LaFerla, F. M. (2009). Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32), 13594–9. doi: 10.1073/pnas.0901402106
- Boer, G. J. (1999). Ethical issues in neurografting of human embryonic cells. *Theoretical Medicine and Bioethics*, 20(5), 461–75. doi: 10.1023/A:1009985223158
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., & Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309(5965), 255–256. doi: 10.1038/309255a0
- Branco, M. J., Nogueira, P., & Contreiras, T. (2005). *Uma observação sobre estimativas da prevalência de algumas doenças crónicas, em Portugal Continental*. Lisboa.
- Brewer, K. L., Bethea, J. R., & Yeziarski, R. P. (1999). Neuroprotective effects of Interleukin-10 following excitotoxic spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 159(2), 484–493. doi: 10.1006/exnr.1999.7173
- Brüstle, O., Jones, K. N., Learish, R. D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O. D., ... McKay, R. D. (1999). Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*, 285(5428), 754–6. doi: 10.1126/science.285.5428.754
- Bushati, N., & Briscoe, J. (2012). Regulation of neuronal subtype identity in the vertebrate neural tube (neuronal subtype identity regulation). doi: 10.1002/9780470015902.a0000795.pub2
- Caiazzo, M., Dell’Anno, M. T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., ... Broccoli, V. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*, 476(7359), 224–7. doi: 10.1038/nature10284
- Camnasio, S., Delli Carri, A., Lombardo, A., Grad, I., Mariotti, C., Castucci, A., ... Cattaneo, E. (2012). The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington’s disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity. *Neurobiology of Disease*, 46(1), 41–51. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.042
- Campos, L. S. (2004). Neurospheres: insights into neural stem cell biology. *Journal of Neuroscience Research*, 78(6), 761–9. doi: 10.1002/jnr.20333
- Carlesi, C., Pasquali, L., Piazza, S., Lo Gerfo, A., Caldarazzo Ienco, E., Alessi, R., ...

- Siciliano, G. (2011). Strategies for clinical approach to neurodegeneration in Amyotrophic lateral sclerosis. *Archives Italiennes de Biologie*, 149(1), 151–67. doi: 10.4449/aib.v149i1.1267
- Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Denham, J., Mujtaba, T., Chiu, C. P., & Rao, M. S. (2001). Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Experimental Neurology*, 172(2), 383–97. doi: 10.1006/exnr.2001.7832
- Carri, A. D., Onorati, M., Lelos, M. J., Castiglioni, V., Faedo, A., Menon, R., ... Cattaneo, E. (2012). Developmentally coordinated extrinsic signals drive human pluripotent stem cell differentiation toward authentic DARPP-32+ medium-sized spiny neurons. *Development*, 140(2). doi: 10.1242/dev.084608
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., & Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, 132(5), 885–96. doi: 10.1242/dev.01670
- Castaño, J., Menendez, P., Bruzos-Cidon, C., Straccia, M., Sousa, A., Zabaleta, L., ... Giorgetti, A. (2014). Fast and efficient neural conversion of human hematopoietic cells. *Stem Cell Reports*, 3(6), 1118–31. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.10.008
- Chae, J.-I., Kim, D.-W., Lee, N., Jeon, Y.-J., Jeon, I., Kwon, J., ... Song, J. (2012). Quantitative proteomic analysis of induced pluripotent stem cells derived from a human Huntington's disease patient. *The Biochemical Journal*, 446(3), 359–71. doi: 10.1042/BJ20111495
- Chamberlain, C. E. C., Jeong, J., Guo, C., Allen, B. L., & McMahon, A. P. (2008). Notochord-derived Shh concentrates in close association with the apically positioned basal body in neural target cells and forms a dynamic gradient during neural patterning. *Development*, 135(6), 1097–1106. doi: 10.1242/dev.013086
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5), 643–55. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00392-1
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., & Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature Biotechnology*, 27(3), 275–80. doi: 10.1038/nbt.1529
- Chanda, S., Ang, C. E., Davila, J., Pak, C., Mall, M., Lee, Q. Y., ... Wernig, M. (2014). Generation of induced neuronal cells by the single reprogramming factor ASCL1. *Stem Cell Reports*, 3(2), 282–96. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.05.020

- Charbord, J., Poydenot, P., Bonnefond, C., Feyeux, M., Casagrande, F., Brinon, B., ... Perrier, A. L. (2013). High throughput screening for inhibitors of REST in neural derivatives of human embryonic stem cells reveals a chemical compound that promotes expression of neuronal genes. *Stem Cells*, 31(9), 1816–28. doi: 10.1002/stem.1430
- Chen, K. G., Mallon, B. S., McKay, R. D. G., & Robey, P. G. (2014). Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. *Cell Stem Cell*, 14(1), 13–26. doi: 10.1016/j.stem.2013.12.005
- Cheng, H., Cao, Y., & Olson, L. (1996). Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science*, 273(5274), 510–3. doi: 10.1126/science.273.5274.510
- Chiò, A., Logroscino, G., Traynor, B., Collins, J., Simeone, J. C., Goldstein, L. A., & White, L. A. (2013). Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*, 41(2), 118–130. doi: 10.1159/000351153
- Choi, S. H., Kim, Y. H., Hebisch, M., Sliwinski, C., Lee, S., D'Avanzo, C., ... Kim, D. Y. (2014). A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature*, 515(7526), 274–278. doi: 10.1038/nature13800
- Chu, K., Kim, M., Chae, S.-H., Jeong, S.-W., Kang, K.-S., Jung, K.-H., ... Yoon, B.-W. (2004). Distribution and in situ proliferation patterns of intravenously injected immortalized human neural stem-like cells in rats with focal cerebral ischemia. *Neuroscience Research*, 50(4), 459–65. doi: 10.1016/j.neures.2004.08.015
- Chu, K., Kim, M., Jeong, S.-W., Kim, S. U., & Yoon, B.-W. (2003). Human neural stem cells can migrate, differentiate, and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia. *Neuroscience Letters*, 343(2), 129–33. doi: 10.1016/S0304-3940(03)00174-5
- Cleveland, D. W. (1999). From Charcot to SOD1: mechanisms of selective motor neuron death in ALS. *Neuron*, 24(3), 515–520. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81108-3
- Colasante, G., Lignani, G., Rubio, A., Medrihan, L., Yekhelef, L., Sessa, A., ... Broccoli, V. (2015). Rapid Conversion of Fibroblasts into Functional Forebrain GABAergic Interneurons by Direct Genetic Reprogramming. *Cell Stem Cell*, 17(6), 719–34. doi: 10.1016/j.stem.2015.09.002
- Colombo, E., Giannelli, S. G., Galli, R., Tagliafico, E., Foroni, C., Tenedini, E., ... Broccoli, V. (2006). Embryonic stem-derived versus somatic neural stem cells: a

- comparative analysis of their developmental potential and molecular phenotype. *Stem Cells*, 24(4), 825–34. doi: 10.1634/stemcells.2005-0313
- Conti, L., & Cattaneo, E. (2010). Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nature Reviews Neuroscience*, 11, 176. doi: 10.1038/nrn2761
- Conti, L., Pollard, S. M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., ... Smith, A. (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biology*, 3(9), e283. doi: 10.1371/journal.pbio.0030283
- Copray, S., Balasubramaniyan, V., Levenga, J., de Bruijn, J., Liem, R., & Boddeke, E. (2006). Olig2 overexpression induces the in vitro differentiation of neural stem cells into mature oligodendrocytes. *Stem Cells*, 24(4), 1001–10. doi: 10.1634/stemcells.2005-0239
- Cordey, M., Limacher, M., Kobel, S., Taylor, V., & Lutolf, M. P. (2008). Enhancing the reliability and throughput of neurosphere culture on hydrogel microwell arrays. *Stem Cells*, 26(10), 2586–94. doi: 10.1634/stemcells.2008-0498
- Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A., & Eggan, K. (2005). Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 309(5739), 1369–73. doi: 10.1126/science.1116447
- Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L. M., Guimarães, K. P., ... Beltrão-Braga, P. C. B. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 534(7606), 267–71. doi: 10.1038/nature18296
- Cummings, B. J., Uchida, N., Tamaki, S. J., Salazar, D. L., Hooshmand, M., Summers, R., ... Anderson, A. J. (2005). Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 14069–74. doi: 10.1073/pnas.0507063102
- Dang, J., Tiwari, S. K., Lichinchi, G., Qin, Y., Patil, V. S., Eroshkin, A. M., & Rana, T. M. (2016). Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell*, 19(2), 258–65. doi: 10.1016/j.stem.2016.04.014
- Danks, M. K., Yoon, K. J., Bush, R. A., Remack, J. S., Wierdl, M., Tsurkan, L., ... Aboody, K. S. (2007). Tumor-targeted enzyme/prodrug therapy mediates long-term disease-free survival of mice bearing disseminated neuroblastoma. *Cancer Research*, 67(1), 22–5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3607

- Dickson, D. W. (2001). Neuropathology of Alzheimer's disease and other dementias. *Clinics in Geriatric Medicine*, 17(2), 209–228. doi: 10.1016/S0749-0690(05)70066-5
- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., ... Egan, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321(5893), 1218–21. doi: 10.1126/science.1158799
- Doble, A. (1996). The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology*, 47(6 Suppl 4), S233-41. doi: 10.1212/WNL.47.6_Suppl_4.233S
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D. A., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), 703–16. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80783-7
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, 36(6), 1021–34. doi: 10.1016/S0896-6273(02)01133-9
- Duinsbergen, D., Salvatori, D., Eriksson, M., & Mikkers, H. (2009). Tumors originating from induced pluripotent stem cells and methods for their prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1176, 197–204. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04563.x
- Eckman, E. A., Watson, M., Marlow, L., Sambamurti, K., & Eckman, C. B. (2003). Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2081–4. doi: 10.1074/jbc.C200642200
- Ehteshami, M., Kabos, P., Gutierrez, M. A. R., Chung, N. H. C., Griffith, T. S., Black, K. L., & Yu, J. S. (2002). Induction of glioblastoma apoptosis using neural stem cell-mediated delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Research*, 62(24), 7170–4. Disponível em <http://cancerres.aacrjournals.org/content/62/24/7170>
- Ehteshami, M., Kabos, P., Kabosova, A., Neuman, T., Black, K. L., & Yu, J. S. (2002). The use of interleukin 12-secreting neural stem cells for the treatment of intracranial glioma. *Cancer Research*, 62(20), 5657–63. Disponível em <http://cancerres.aacrjournals.org/content/62/20/5657.long>
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., ... Sasai, Y.

- (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 472(7341), 51–6. doi: 10.1038/nature09941
- Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., ... Sasai, Y. (2008). Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell*, 3(5), 519–32. doi: 10.1016/j.stem.2008.09.002
- El-Akabawy, G., Rattray, I., Johansson, S. M., Gale, R., Bates, G., & Modo, M. (2012). Implantation of undifferentiated and pre-differentiated human neural stem cells in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *BMC Neuroscience*, 13, 97. doi: 10.1186/1471-2202-13-97
- Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N. D., Tabar, V., & Studer, L. (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes & Development*, 22(2), 152–65. doi: 10.1101/gad.1616208
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., & Jessell, T. M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell*, 87(4), 661–673. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81386-0
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–6. doi: 10.1038/292154a0
- Falush, D., Almqvist, E. W., Brinkmann, R. R., Iwasa, Y., & Hayden, M. R. (2001). Measurement of mutational flow implies both a high new-mutation rate for Huntington disease and substantial underascertainment of late-onset cases. *American Journal of Human Genetics*, 68(2), 373–85. doi: 10.1086/318193
- Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E. A., Frosch, M. P., ... Guenette, S. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4162–7. doi: 10.1073/pnas.0230450100
- Feng, L., Hatten, M. E., & Heintz, N. (1994). Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron*, 12(4), 895–908. doi: 10.1016/0896-6273(94)90341-7
- Fischer, W., Wictorin, K., Björklund, A., Williams, L. R., Varon, S., & Gage, F. H. (1987). Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature*, 329(6134), 65–8. doi:

10.1038/329065a0

- Fraichard, A., Chassande, O., Bilbaut, G., Dehay, C., Savatier, P., & Samarut, J. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *Journal of Cell Science*, 108, 3181–8. Disponível em <http://jcs.biologists.org/content/108/10/3181>
- Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Tsai, W. Y., DuMouchel, W., Kao, R., ... Fahn, S. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, 344(10), 710–9. doi: 10.1056/NEJM200103083441002
- Fricker, R. A., Carpenter, M. K., Winkler, C., Greco, C., Gates, M. A., & Björklund, A. (1999). Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *The Journal of Neuroscience*, 19(14), 5990–6005. Disponível em <http://jneurosci.org/content/19/14/5990.long>
- Gabay, L., Lowell, S., Rubin, L. L., & Anderson, D. J. (2003). Deregulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in vitro. *Neuron*, 40(3), 485–499. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00637-8
- Galli, R., Gritti, A., Bonfanti, L., & Vescovi, A. L. (2003). Neural stem cells: an overview. *Circulation Research*, 92(6), 598–608. doi: 10.1161/01.RES.0000065580.02404.F4
- Gallina, P., Paganini, M., Lombardini, L., Saccardi, R., Marini, M., De Cristofaro, M. T., ... Di Lorenzo, N. (2008). Development of human striatal anlagen after transplantation in a patient with Huntington's disease. *Experimental Neurology*, 213(1), 241–4. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.06.003
- Garavaglia, A., Moiana, A., Camnasio, S., Bolognini, D., Papait, R., Rigamonti, D., ... Harrington, J. (2010). Adaptation of NS cells growth and differentiation to high-throughput screening-compatible plates. *BMC Neuroscience*, 11(7). doi: 10.1186/1471-2202-11-7
- Garcez, P. P., Loiola, E. C., Madeiro da Costa, R., Higa, L. M., Trindade, P., Delvecchio, R., ... Rehen, S. K. (2016). Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*, 352(6287), 816–8. doi: 10.1126/science.aaf6116
- Garcion, E., Halilagic, A., Faissner, A., & ffrench-Constant, C. (2004). Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development*, 131(14), 3423–32. doi: 10.1242/dev.01202
- Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J. P., Rangone, H.,

- Cordelières, F. P., ... Saudou, F. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, 118(1), 127–38. doi: 10.1016/j.cell.2004.06.018
- Gebel, J. M., & Broderick, J. P. (2000). Intracerebral hemorrhage. *Neurologic Clinics*, 18(2), 419–38.
- Glaser, T., Perez-Bouza, A., Klein, K., & Brüstle, O. (2005). Generation of purified oligodendrocyte progenitors from embryonic stem cells. *The FASEB Journal*, 19(1), 112–4. doi: 10.1096/fj.04-1931fje
- Glass, J. D., Boulis, N. M., Johe, K., Rutkove, S. B., Federici, T., Polak, M., ... Feldman, E. L. (2012). Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of a phase I trial in 12 patients. *Stem Cells*, 30(6), 1144–51. doi: 10.1002/stem.1079
- Gossler, A., Joyner, A. L., Rossant, J., & Skarnes, W. C. (1989). Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science*, 244(4903), 463–5. doi: 10.1126/science.2497519
- Götz, M. (2003). Glial cells generate neurons - master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells. *Neuroscientist*, 9(5), 379–97. doi: 10.1177/1073858403257138
- Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(10), 777–88. doi: 10.1038/nrm1739
- Grassi Zucconi, G., & Giuditta, A. (2002). Is it only neurogenesis? *Reviews in the Neurosciences*, 13(4), 375–82. doi: 10.1515/REVNEURO.2002.13.4.375
- Grealish, S., Diguët, E., Kirkeby, A., Mattsson, B., Heuer, A., Bramoulle, Y., ... Parmar, M. (2014). Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson’s disease. *Cell Stem Cell*, 15(5), 653–65. doi: 10.1016/j.stem.2014.09.017
- Gritti, A., Galli, R., & Vescovi, A. L. (2001). Cultures of stem cells of the central nervous system. In S. Fedoroff & A. Richardson (Eds.), *Protocols for Neural Cell Culture* (3^a, pp. 173–197). New Jersey: Humana Press. doi: 10.1385/1-59259-207-4:173
- Gritti, A., Parati, E. A., Cova, L., Frolichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., ... Vescovi, A. L. (1996). Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *The Journal of Neuroscience*, 16(3), 1091–100. Disponível em <http://jneurosci.org/content/16/3/1091>
- Guillaume, D. J., & Zhang, S.-C. (2008). Human embryonic stem cells: a potential source

- of transplantable neural progenitor cells. *Neurosurgical Focus*, 24(3–4), E3. doi: 10.3171/FOC/2008/24/3-4/E2
- Gumpel, M., Lachapelle, F., Gansmuller, A., Baulac, M., Baron van Evercooren, A., & Baumann, N. (1987). Transplantation of human embryonic oligodendrocytes into shiverer brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 495, 71–85. doi: 10.1111/j.1749-6632.1987.tb23666.x
- Gurdon, J. B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 10, 622–40. Disponível em <http://dev.biologists.org/content/10/4/622.long>
- Gusella, J. F., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., ... Martin, J. B. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, 306(5940), 234–38. doi: 10.1038/306234a0
- Gutova, M., Najbauer, J., Chen, M. Y., Potter, P. M., Kim, S. U., & Aboody, K. S. (2010). Therapeutic targeting of melanoma cells using neural stem cells expressing carboxylesterase, a CPT-11 activating enzyme. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 5(3), 273–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19951251>
- Hagell, P., & Brundin, P. (2001). Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(8), 741–52. doi: 10.1093/jnen/60.8.741
- Hagell, P., Schrag, A., Piccini, P., Jahanshahi, M., Brown, R., Rehncrona, S., ... Lindvall, O. (1999). Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. *Brain: A Journal of Neurology*, 122(6), 1121–32. doi: 10.1093/brain/122.6.1121
- Haines, D. E. (Ed.). (2013). *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications* (4^a). Elsevier Saunders.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–6. doi: 10.1126/science.1072994
- Hargus, G., Ehrlich, M., Hallmann, A.-L., & Kuhlmann, T. (2014). Human stem cell models of neurodegeneration: a novel approach to study mechanisms of disease development. *Acta Neuropathologica*, 127(2), 151–73. doi: 10.1007/s00401-013-1222-6

- Harper, J. M., Krishnan, C., Darman, J. S., Deshpande, D. M., Peck, S., Shats, I., ... Kerr, D. A. (2004). Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), 7123–8. doi: 10.1073/pnas.0401103101
- Harrison, R. G. (1907). Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record*, 1(5), 116–28. doi: 10.1002/ar.1090010503
- Hauser, R. A., Furtado, S., Cimino, C. R., Delgado, H., Eichler, S., Schwartz, S., ... Freeman, T. B. (2002). Bilateral human fetal striatal transplantation in Huntington's disease. *Neurology*, 58(5), 687–95. doi: 10.1212/WNL.58.5.687
- Hefferan, M. P., Galik, J., Kakinohana, O., Sekerkova, G., Santucci, C., Marsala, S., ... Marsala, M. (2012). Human neural stem cell replacement therapy for amyotrophic lateral sclerosis by spinal transplantation. *PloS One*, 7(8), e42614. doi: 10.1371/journal.pone.0042614
- Hefti, F. (1986). Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *The Journal of Neuroscience*, 6(8), 2155–62. Disponível em <http://jneurosci.org/content/6/8/2155.long>
- Hemming, M. L., Patterson, M., Reske-Nielsen, C., Lin, L., Isacson, O., & Selkoe, D. J. (2007). Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an Abeta-degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer disease. *PLoS Medicine*, 4(8), e262. doi: 10.1371/journal.pmed.0040262
- Hinds, J. W., & Ruffett, T. L. (1971). Cell proliferation in the neural tube: An electron microscopic and Golgi analysis in the mouse cerebral vesicle. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat*, 115(2), 226–64. doi: 10.1007/BF00391127
- Horner, P. J., & Gage, F. H. (2000). Regenerating the damaged central nervous system. *Nature*, (407), 963–70. doi: 10.1038/35039559
- Huang, Z., de la Fuente-Fernández, R., & Stoessl, A. J. (2003). Etiology of Parkinson's Disease. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 30(S1), S10-8. doi: 10.1017/s031716710000319x
- Hwang, D. H., Lee, H. J., Park, I. H., Seok, J. I., Kim, B. G., Joo, I. S., & Kim, S. U. (2009). Intrathecal transplantation of human neural stem cells overexpressing VEGF provide behavioral improvement, disease onset delay and survival extension in transgenic ALS mice. *Gene Therapy*, 16(10), 1234–44. doi: 10.1038/gt.2009.80
- Ibach, B., & Haen, E. (2004). Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease.

- Current Pharmaceutical Design*, 10(3), 231–51. doi: 10.2174/1381612043386509
- Imitola, J., Raddassi, K., Park, K. I., Mueller, F.-J., Nieto, M., Teng, Y. D., ... Khoury, S. J. (2004). Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(52), 18117–22. doi: 10.1073/pnas.0408258102
- Isaacson, L. G., Saffran, B. N., & Crutcher, K. A. (1990). Intracerebral NGF Infusion Induces Hyperinnervation of Cerebral Blood Vessels. *Neurobiology of Aging*, 11, 51–55. doi: 10.1016/0197-4580(90)90062-5
- Israel, M. A., Yuan, S. H., Bardy, C., Reyna, S. M., Mu, Y., Herrera, C., ... Goldstein, L. S. B. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482(7384), 216–20. doi: 10.1038/nature10821
- Iwanami, A., Kaneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., ... Okano, H. (2005). Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *Journal of Neuroscience Research*, 80(2), 182–90. doi: 10.1002/jnr.20436
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N. P., ... Saido, T. C. (2001). Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. *Science*, 292(5521), 1550–2. doi: 10.1126/science.1059946
- Jacobsen, J. S., Comery, T. A., Martone, R. L., Elokda, H., Crandall, D. L., Oganessian, A., ... Pangalos, M. N. (2008). Enhanced clearance of A β in brain by sustaining the plasmin proteolysis cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(25), 8754–9. doi: 10.1073/pnas.0710823105
- Jaenisch, R. (2004). Human cloning - the science and ethics of nuclear transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 351(27), 2787–91. doi: 10.1056/NEJMp048304
- Jeon, I., Lee, N., Li, J.-Y., Park, I.-H., Park, K. S., Moon, J., ... Song, J. (2012). Neuronal properties, in vivo effects, and pathology of a Huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 30(9), 2054–62. doi: 10.1002/stem.1135
- Jeong, S.-W., Chu, K., Jung, K.-H., Kim, S. U., Kim, M., & Roh, J.-K. (2003). Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 34(9), 2258–63. doi: 10.1161/01.STR.0000083698.20199.1F
- Joo, K. M., Park, I. H., Shin, J. Y., Jin, J., Kang, B. G., Kim, M. H., ... Nam, D.-H. (2009).

- Human neural stem cells can target and deliver therapeutic genes to breast cancer brain metastases. *Molecular Therapy*, 17(3), 570–5. doi: 10.1038/mt.2008.290
- Kadoshima, T., Sakaguchi, H., Nakano, T., Soen, M., Ando, S., Eiraku, M., & Sasai, Y. (2013). Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(50), 20284–9. doi: 10.1073/pnas.1315710110
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (Eds.). (2013). *Principles of Neural Science* (5^a). Nova Iorque: McGraw-Hill.
- Karimi-Abdolrezaee, S., Eftekharpour, E., Wang, J., Morshead, C. M., & Fehlings, M. G. (2006). Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, 26(13), 3377–89. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4184-05.2006
- Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., ... Sasai, Y. (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*, 28(1), 31–40. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00083-0
- Keirstead, H. S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., & Steward, O. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, 25(19), 4694–705. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0311-05.2005
- Kelava, I., & Lancaster, M. A. (2016). Stem Cell Models of Human Brain Development. *Cell Stem Cell*, 18(6), 736–48. doi: 10.1016/j.stem.2016.05.022
- Keller, G. M. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(6), 862–9. doi: 10.1016/0955-0674(95)80071-9
- Kelly, S., Bliss, T. M., Shah, A. K., Sun, G. H., Ma, M., Foo, W. C., ... Steinberg, G. K. (2004). Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(32), 11839–44. doi: 10.1073/pnas.0404474101
- Kerr, D. A., Lladó, J., Shamblott, M. J., Maragakis, N. J., Irani, D. N., Crawford, T. O., ... Rothstein, J. D. (2003). Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *The Journal of Neuroscience*,

- 23(12), 5131–40. Disponível em <http://jneurosci.org/content/23/12/5131.long>
- Kielman, M. F., Rindapää, M., Gaspar, C., van Poppel, N., Breukel, C., van Leeuwen, S., ... Fodde, R. (2002). Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nature Genetics*, 32(4), 594–605. doi: 10.1038/ng1045
- Kim, H. M., Hwang, D. H., Lee, J. E., Kim, S. U., & Kim, B. G. (2009). Ex vivo VEGF delivery by neural stem cells enhances proliferation of glial progenitors, angiogenesis, and tissue sparing after spinal cord injury. *PloS One*, 4(3), e4987. doi: 10.1371/journal.pone.0004987
- Kim, H.-S., Kim, J., Jo, Y., Jeon, D., & Cho, Y. S. (2014). Direct lineage reprogramming of mouse fibroblasts to functional midbrain dopaminergic neuronal progenitors. *Stem Cell Research*, 12(1), 60–8. doi: 10.1016/j.scr.2013.09.007
- Kim, J., Su, S. C., Wang, H., Cheng, A. W., Cassady, J. P., Lodato, M. A., ... Jaenisch, R. (2011). Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 9(5), 413–9. doi: 10.1016/j.stem.2011.09.011
- Kim, J.-H., Auerbach, J. M., Rodríguez-Gómez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., ... McKay, R. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, 418(6893), 50–6. doi: 10.1038/nature00900
- Kim, S. U. (2004). Human neural stem cells genetically modified for brain repair in neurological disorders. *Neuropathology*, 24(3), 159–71. doi: 10.1111/j.1440-1789.2004.00552.x
- Kim, S. U., Lee, H. J., & Kim, Y. B. (2013). Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. *Neuropathology*, 33(5), 491–504. doi: 10.1111/neup.12020
- Kim, S.-K., Cargioli, T. G., Machluf, M., Yang, W., Sun, Y., Al-Hashem, R., ... Carroll, R. S. (2005). PEX-producing human neural stem cells inhibit tumor growth in a mouse glioma model. *Clinical Cancer Research*, 11(16), 5965–70. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0371
- Kim, Y. H., Choi, S. H., D'Avanzo, C., Hebisch, M., Sliwinski, C., Bylykbashi, E., ... Kim, D. Y. (2015). A 3D human neural cell culture system for modeling Alzheimer's disease. *Nature Protocols*, 10(7), 985–1006. doi: 10.1038/nprot.2015.065
- Kintner, C. (2002). Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells. *The Journal of Neuroscience*, 22(3), 639–43. Disponível em

- <http://jneurosci.org/content/22/3/639.long>
- Kirkeby, A., Grealish, S., Wolf, D. A., Nelander, J., Wood, J., Lundblad, M., ... Parmar, M. (2012). Generation of Regionally Specified Neural Progenitors and Functional Neurons from Human Embryonic Stem Cells under Defined Conditions. *Cell Reports*, 1(6), 703–714. doi: 10.1016/j.celrep.2012.04.009
- Kondo, T., Asai, M., Tsukita, K., Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Sunada, Y., ... Suzuki, N. (2013). Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*, 12(4), 487–96. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.009
- Kordower, J. H., Goetz, C. G., Freeman, T. B., & Olanow, C. W. (1997). Dopaminergic transplants in patients with Parkinson's disease: neuroanatomical correlates of clinical recovery. *Experimental Neurology*, 144(1), 41–6. doi: 10.1006/exnr.1996.6386
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 149–84. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600
- Ladher, R., & Schoenwolf, G. C. (2005). Making a neural tube: neural induction and neurulation. In M. S. Rao & M. Jacobson (Eds.), *Developmental Neurobiology* (4^a). Nova Iorque: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 345(6194), 1247125. doi: 10.1126/science.1247125
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., ... Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501(7467), 373–9. doi: 10.1038/nature12517
- Larry W. Swanson. (2000). What is the brain? *Trends in Neuroscience*, 23(11), 519–527. doi: 10.1016/S0166-2236(00)01639-8
- Lee, D.-H., Ahn, Y., Kim, S. U., Wang, K.-C., Cho, B.-K., Phi, J. H., ... Kim, S.-K. (2009). Targeting rat brainstem glioma using human neural stem cells and human mesenchymal stem cells. *Clinical Cancer Research*, 15(15), 4925–34. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3076
- Lee, H. J., Kim, K. S., Kim, E. J., Choi, H. B., Lee, K. H., Park, I. H., ... Kim, S. U. (2007). Brain transplantation of immortalized human neural stem cells promotes functional recovery in mouse intracerebral hemorrhage stroke model. *Stem Cells*,

- 25(5), 1204–12. doi: 10.1634/stemcells.2006-0409
- Lee, H. J., Kim, M. K., Kim, H. J., & Kim, S. U. (2009). Human neural stem cells genetically modified to overexpress Akt1 provide neuroprotection and functional improvement in mouse stroke model. *PloS One*, 4(5), e5586. doi: 10.1371/journal.pone.0005586
- Lee, H., Shamy, G. Al, Elkabetz, Y., Schofield, C. M., Harrision, N. L., Panagiotakos, G., ... Studer, L. (2007). Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem Cells*, 25(8), 1931–9. doi: 10.1634/stemcells.2007-0097
- Lee, H.-K., Velazquez Sanchez, C., Chen, M., Morin, P. J., Wells, J. M., Hanlon, E. B., & Xia, W. (2016). Three Dimensional Human Neuro-Spheroid Model of Alzheimer's Disease Based on Differentiated Induced Pluripotent Stem Cells. *PloS One*, 11(9), e0163072. doi: 10.1371/journal.pone.0163072
- Lendahl, U., Zimmerman, L. B., & McKay, R. D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60(4), 585–95. doi: 10.1016/0092-8674(90)90662-X
- Li, M., Pevny, L., Lovell-Badge, R., & Smith, A. (1998). Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Current Biology*, 8(17), 971–4. doi: 10.1016/S0960-9822(98)70399-9
- Li, S., Tokuyama, T., Yamamoto, J., Koide, M., Yokota, N., & Namba, H. (2005). Bystander effect-mediated gene therapy of gliomas using genetically engineered neural stem cells. *Cancer Gene Therapy*, 12(7), 600–7. doi: 10.1038/sj.cgt.7700826
- Li, X.-J., Du, Z.-W., Zarnowska, E. D., Pankratz, M., Hansen, L. O., Pearce, R. A., & Zhang, S.-C. (2005). Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 23(2), 215–21. doi: 10.1038/nbt1063
- Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H. J., Yoder, M. C., & Chan, R. J. (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood*, 105(2), 635–7. doi: 10.1182/blood-2004-07-2681
- Lindsay, J., Laurin, D., Verreault, R., Hébert, R., Helliwell, B., Hill, G. B., & McDowell, I. (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *American Journal of Epidemiology*, 156(5), 445–53. doi: 10.1093/aje/kwf074
- Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehnecrona, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., ...

- Marsden, C. D. (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*, 247(4942), 574–7. doi: 10.1126/science.2105529
- Lindvall, O., Widner, H., Rehnström, S., Brundin, P., Odin, P., Gustavii, B., ... Rothwell, J. C. (1992). Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Annals of Neurology*, 31(2), 155–65. doi: 10.1002/ana.410310206
- Lippmann, E. S., Al-Ahmad, A., Azarin, S. M., Palecek, S. P., & Shusta, E. V. (2014). A retinoic acid-enhanced, multicellular human blood-brain barrier model derived from stem cell sources. *Scientific Reports*, 4, 4160. doi: /10.1038/srep04160
- Lippmann, E. S., Al-Ahmad, A., Palecek, S. P., & Shusta, E. V. (2013). Modeling the blood-brain barrier using stem cell sources. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10(1), 2. doi: 10.1186/2045-8118-10-2
- Lippmann, E. S., Azarin, S. M., Kay, J. E., Nessler, R. A., Wilson, H. K., Al-Ahmad, A., ... Shusta, E. V. (2012). Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 30(8), 783–91. doi: 10.1038/nbt.2247
- Liu, A., & Niswander, L. A. (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 945–954. doi: 10.1038/nrn1805
- Liu, S., Qu, Y., Stewart, T. J., Howard, M. J., Chakraborty, S., Holekamp, T. F., & McDonald, J. W. (2000). Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), 6126–31. doi: 10.1073/pnas.97.11.6126
- Liu, X., Bolteus, A. J., Balkin, D. M., Henschel, O., & Bordey, A. (2006). GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia*, 54(5), 394–410. doi: 10.1002/glia.20392
- Liu, X., Li, F., Stubblefield, E. A., Blanchard, B., Richards, T. L., Larson, G. A., ... Li, C.-Y. (2012). Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells. *Cell Research*, 22(2), 321–32. doi: 10.1038/cr.2011.181
- Logroscino, G., Traynor, B. J., Hardiman, O., Chiò, A., Mitchell, D., Swigler, R. J., ... Beghi, E. (2010). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *Journal of*

- Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 81(4), 385–90. doi: 10.1136/jnnp.2009.183525
- Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162), 1145–8. doi: 10.1126/science.8178174
- Ludwig, T. E., Bergendahl, V., Levenstein, M. E., Yu, J., Probasco, M. D., & Thomson, J. A. (2006). Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nature Methods*, 3(8), 637–46. doi: 10.1038/nmeth902
- Luskin, M. B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 11(1), 173–89. doi: 10.1016/0896-6273(93)90281-U
- Ma, L., Hu, B., Liu, Y., Vermilyea, S. C., Liu, H., Gao, L., ... Zhang, S.-C. (2012). Human embryonic stem cell-derived GABA neurons correct locomotion deficits in quinolinic acid-lesioned mice. *Cell Stem Cell*, 10(4), 455–64. doi: 10.1016/j.stem.2012.01.021
- MacDonald, J. W., Liu, X.-Z., Qu, Y., Liu, S., Michey, S. K., Turetsky, D., ... Choi, D. W. (1999). Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Medicine*, 5(12), 1410–2. doi: 10.1038/70986
- Mariani, J., Coppola, G., Zhang, P., Abyzov, A., Provini, L., Tomasini, L., ... Vaccarino, F. M. (2015). FOXP1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell*, 162(2), 375–90. doi: 10.1016/j.cell.2015.06.034
- Mariani, J., Simonini, M. V., Palejev, D., Tomasini, L., Coppola, G., Szekely, A. M., ... Vaccarino, F. M. (2012). Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12770–5. doi: 10.1073/pnas.1202944109
- Marro, S., Pang, Z. P., Yang, N., Tsai, M.-C., Qu, K., Chang, H. Y., ... Wernig, M. (2011). Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell Stem Cell*, 9(4), 374–82. doi: 10.1016/j.stem.2011.09.002
- Marshall, G. P., Reynolds, B. A., & Laywell, E. D. (2007). Using the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 8(3), 141–5. doi: 10.2174/138920107780906559
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., & Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse

- embryonic stem cells. *The EMBO Journal*, 18(15), 4261–9. doi: 10.1093/emboj/18.15.4261
- Mayeux, R. (2003). Epidemiology of Neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*, 26, 81–104. doi: 10.1146/annurev.neuro.26.043002.094919
- McConnell, S. K. (1995). Constructing the cerebral cortex: Neurogenesis and fate determination. *Neuron*, 15(4), 761–768. doi: 10.1016/0896-6273(95)90168-X
- McDonald, J. W., Liu, X. Z., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S. K., Turetsky, D., ... Choi, D. W. (1999). Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Medicine*, 5(12), 1410–2. doi: 10.1038/70986
- McFarlin, D. E., & McFarland, H. F. (1982). Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 307(19), 1183–1188. doi: 10.1056/NEJM198211043071905
- McKay, R. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science*, 276(5309), 66–71. doi: 10.1126/science.276.5309.66
- McTigue, D. M., Horner, P. J., Stokes, B. T., & Gage, F. H. (1998). Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, 18(14), 5354–65. Disponível em <http://www.jneurosci.org/content/18/14/5354.long>
- Medvedev, S. P., Shevchenko, A. I., & Zakian, S. M. (2010). Induced pluripotent stem cells: problems and advantages when applying them in regenerative medicine. *Acta Naturae*, 2(2), 18–28. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347549/>
- Melchor, J. P., Pawlak, R., & Strickland, S. (2003). The tissue plasminogen activator-plasminogen proteolytic cascade accelerates amyloid-beta (Abeta) degradation and inhibits Abeta-induced neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience*, 23(26), 8867–71. Disponível em <http://jneurosci.org/content/23/26/8867.long>
- Merchant, C., Tang, M. X., Albert, S., Manly, J., Stern, Y., & Mayeux, R. (1999). The influence of smoking on the risk of Alzheimer's disease. *Neurology*, 52(7), 1408–12. doi: 10.1212/WNL.52.7.1408
- Miles, G. B., Yohn, D. C., Wichterle, H., Jessell, T. M., Rafuse, V. F., & Brownstone, R. M. (2004). Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. *The Journal of Neuroscience*, 24(36), 7848–58. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1972-04.2004

- Minami, H., Tashiro, K., Okada, A., Hirata, N., Yamaguchi, T., Takayama, K., ... Kawabata, K. (2015). Generation of Brain Microvascular Endothelial-Like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells by Co-Culture with C6 Glioma Cells. *PloS One*, 10(6), e0128890. doi: 10.1371/journal.pone.0128890
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., ... Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), 631–42. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00393-3
- Morshead, C. M., Benveniste, P., Iscove, N. N., & van der Kooy, D. (2002). Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nature Medicine*, 8(3), 268–273. doi: 10.1038/nm0302-268
- Moviglia, G. A., Varela, G., Brizuela, J. A., Moviglia Brandolino, M. T., Farina, P., Etchegaray, G., ... Blassetti, N. (2009). Case report on the clinical results of a combined cellular therapy for chronic spinal cord injured patients. *Spinal Cord*, 47(6), 499–503. doi: 10.1038/sc.2008.164
- Mueller-Steiner, S., Zhou, Y., Arai, H., Roberson, E. D., Sun, B., Chen, J., ... Gan, L. (2006). Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron*, 51(6), 703–14. doi: 10.1016/j.neuron.2006.07.027
- Muffat, J., Li, Y., Yuan, B., Mitalipova, M., Omer, A., Corcoran, S., ... Jaenisch, R. (2016). Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nature Medicine*. doi: 10.1038/nm.4189
- Muguruma, K., Nishiyama, A., Kawakami, H., Hashimoto, K., & Sasai, Y. (2015). Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Reports*, 10(4), 537–50. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.051
- Mumenthaler, M., & Mattle, H. (2006). *Fundamentals of Neurology: An Illustrated Guide* (1^a). Thieme.
- Muñoz-Sanjuán, I., & Brivanlou, A. H. (2002). Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(4), 271–80. doi: 10.1038/nrn786
- Murrell, W., Palmero, E., Bianco, J., Stangeland, B., Joel, M., Paulson, L., ... Langmoen, I. A. (2013). Expansion of multipotent stem cells from the adult human brain. *PloS One*, 8(8), e71334. doi: 10.1371/journal.pone.0071334

- Musiał, A., Bajda, M., & Malawska, B. (2007). Recent developments in cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 14(25), 2654–79. doi: 10.2174/092986707782023217
- Nakano, T., Ando, S., Takata, N., Kawada, M., Muguruma, K., Sekiguchi, K., ... Sasai, Y. (2012). Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell*, 10(6), 771–85. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.009
- Nasonkin, I., Mahairaki, V., Xu, L., Hatfield, G., Cummings, B. J., Eberhart, C., ... Koliatsos, V. E. (2009). Long-term, stable differentiation of human embryonic stem cell-derived neural precursors grafted into the adult mammalian neostriatum. *Stem Cells*, 27(10), 2414–26. doi: g/10.1002/stem.177
- Nasu, M., Takata, N., Danjo, T., Sakaguchi, H., Kadoshima, T., Futaki, S., ... Sasai, Y. (2012). Robust formation and maintenance of continuous stratified cortical neuroepithelium by laminin-containing matrix in mouse ES cell culture. *PloS One*, 7(12), e53024. doi: 10.1371/journal.pone.0053024
- National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. (2015, 13 de Novembro). New brain imaging technique identifies previously undetected epileptic seizure sites. *ScienceDaily*. Disponível em www.sciencedaily.com/releases/2015/11/151113144718.htm
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., ... Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95(3), 379–91. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81769-9
- Nishikawa, S.-I., Jakt, L. M., & Era, T. (2007). Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(6), 502–7. doi: 10.1038/nrm2189
- Nistor, G. I., Totoiu, M. O., Haque, N., Carpenter, M. K., & Keirstead, H. S. (2005). Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia*, 49(3), 385–96. doi: 10.1002/glia.20127
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., & Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & Development*, 12(13), 2048–60. doi: 10.1101/gad.12.13.2048
- Niwa, H., Miyazaki, J., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24(4),

- 372–6. doi: 10.1038/74199
- Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A. C., Segal, M., & McKay, R. D. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mechanisms of Development*, 59(1), 89–102. doi: 10.1016/0925-4773(96)00572-2
- Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151), 313–7. doi: 10.1038/nature05934
- Olanow, C. W., Goetz, C. G., Kordower, J. H., Stoessl, A. J., Sossi, V., Brin, M. F., ... Freeman, T. B. (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 54(3), 403–14. doi: 10.1002/ana.10720
- Onorati, M., Camnasio, S., Binetti, M., Jung, C. B., Moretti, A., & Cattaneo, E. (2010). Neuropotent self-renewing neural stem (NS) cells derived from mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 43(3), 287–95. doi: 10.1016/j.mcn.2009.12.002
- Ozolek, J. A., Jane, E. P., Esplen, J. E., Petrosko, P., Wehn, A. K., Erb, T. M., ... Sammak, P. J. (2010). In vitro neural differentiation of human embryonic stem cells using a low-density mouse embryonic fibroblast feeder protocol. *Methods in Molecular Biology*, 584, 71–95. doi: 10.1007/978-1-60761-369-5_4
- Ozone, C., Suga, H., Eiraku, M., Kadoshima, T., Yonemura, S., Takata, N., ... Rossi, G. L. (2016). Functional anterior pituitary generated in self-organizing culture of human embryonic stem cells. *Nature Communications*, 7, 10351. doi: 10.1038/ncomms10351
- Pang, Z. P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D. R., Yang, T. Q., ... Wernig, M. (2011). Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*, 476(7359), 220–3. doi: 10.1038/nature10202
- Park, D., Joo, S. S., Kim, T. K., Lee, S. H., Kang, H., Lee, H. J., ... Kim, S. U. (2012). Human neural stem cells overexpressing choline acetyltransferase restore cognitive function of kainic acid-induced learning and memory deficit animals. *Cell Transplantation*, 21(1), 365–71. doi: 10.3727/096368911X586765
- Park, D., Lee, H. J., Joo, S. S., Bae, D.-K., Yang, G., Yang, Y.-H., ... Kim, S. U. (2012). Human neural stem cells over-expressing choline acetyltransferase restore cognition in rat model of cognitive dysfunction. *Experimental Neurology*, 234(2), 521–6. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.12.040

- Paşca, A. M., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Tian, Y., Makinson, C. D., Huber, N., ... Paşca, S. P. (2015). Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature Methods*, 12(7), 671–8. doi: 10.1038/nmeth.3415
- Perrier, A. L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M. E., Bruses, J., Topf, N., ... Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12543–8. doi: 10.1073/pnas.0404700101
- Peschanski, M., Defer, G., N’Guyen, J. P., Ricolfi, F., Monfort, J. C., Remy, P., ... Jeny, R. (1994). Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson’s disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. *Brain: A Journal of Neurology*, 117(3), 487–99. doi: 10.1093/brain/117.3.487
- Phillips, W., Michell, A. W., & Barker, R. A. (2006). Neurogenesis in Diseases of the Central Nervous System. *Stem Cells and Development*, 15(3), 359–379. doi: 10.1089/scd.2006.15.359
- Piao, J., Major, T., Auyeung, G., Policarpio, E., Menon, J., Droms, L., ... Brown, M. L. (2015). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors remyelinate the brain and rescue behavioral deficits following radiation. *Cell Stem Cell*, 16(2), 198–210. doi: 10.1016/j.stem.2015.01.004
- Piccini, P., Brooks, D. J., Björklund, A., Gunn, R. N., Grasby, P. M., Rimoldi, O., ... Lindvall, O. (1999). Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson’s patient. *Nature Neuroscience*, 2(12), 1137–40. doi: 10.1038/16060
- Platel, J.-C., Gordon, V., Heintz, T., & Bordey, A. (2009). GFAP-GFP neural progenitors are antigenically homogeneous and anchored in their enclosed mosaic niche. *Glia*, 57(1), 66–78. doi: 10.1002/glia.20735
- Pollard, S. M., Conti, L., Sun, Y., Goffredo, D., & Smith, A. (2006). Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cerebral Cortex*, 16(Suppl 1), i112–20. doi: 10.1093/cercor/bhj167
- Potten, C. S., & Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, 110(4), 1001–20.
- Pringsheim, T., Wiltshire, K., Day, L., Dykeman, J., Steeves, T., & Jette, N. (2012). The incidence and prevalence of Huntington’s disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, 27(9), 1083–1091. doi: 10.1002/mds.25075
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.

- O., & Williams, S. M. (Eds.). (2004). *Neuroscience* (3^a). Sunderland, Massachusetts E.U.A.: Sinauer Associates, Inc.
- Puschmann, T. B., Zandén, C., De Pablo, Y., Kirchhoff, F., Pekna, M., Liu, J., & Pekny, M. (2013). Bioactive 3D cell culture system minimizes cellular stress and maintains the in vivo-like morphological complexity of astroglial cells. *Glia*, 61(3), 432–40. doi: 10.1002/glia.22446
- Qian, X., Nguyen, H. N., Song, M. M., Hadiono, C., Ogden, S. C., Hammack, C., ... Ming, G.-L. (2016). Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell*, 165(5), 1238–54. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.032
- Qin, Y., & Gao, W.-Q. (2016). Concise Review: Patient-Derived Stem Cell Research for Monogenic Disorders. *Stem Cells*, 34(1), 44–54. doi: 10.1002/stem.2112
- Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C., & Govoni, S. (2004). Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacological Research*, 50(4), 441–51. doi: 10.1016/j.phrs.2003.12.027
- Rakic, P. (1995). A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends in Neurosciences*, 18(9), 383–388. doi: 10.1016/0166-2236(95)93934-P
- Rao, R. C., Boyd, J., Padmanabhan, R., Chenoweth, J. G., & McKay, R. D. (2009). Efficient serum-free derivation of oligodendrocyte precursors from neural stem cell-enriched cultures. *Stem Cells*, 27(1), 116–25. doi: 10.1634/stemcells.2007-0205
- Recanatini, M., & Valenti, P. (2004). Acetylcholinesterase inhibitors as a starting point towards improved Alzheimer's disease therapeutics. *Current Pharmaceutical Design*, 10(25), 3157–66. doi: 10.2174/1381612043383313
- Reubinoff, B. E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M. F., Reinhartz, E., Itzik, A., & Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(12), 1134–40. doi: 10.1038/nbt1201-1134
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., & Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology*, 18(4), 399–404. doi: 10.1038/74447
- Reynolds, B. A., Tetzlaff, W., & Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 12(11), 4565–74. Disponível em <http://jneurosci.org/content/12/11/4565.long>
- Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated

- cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052), 1707–10. doi: 10.1126/science.1553558
- Rogaeva, E. A., Fafel, K. C., Song, Y. Q., Medeiros, H., Sato, C., Liang, Y., ... St George-Hyslop, P. (2001). Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases: 21 novel mutations. *Neurology*, 57(4), 621–5. doi: 10.1212/WNL.57.4.621
- Rogers, C., Moody, S. A., & Casey, E. (2009). Neural induction and factors that stabilize a neural fate. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 87(3), 249–62. doi: 10.1002/bdrc.20157
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., ... Brown, R. H. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59–62. doi: 10.1038/362059a0
- Rosser, A. E., Barker, R. A., Harrower, T., Watts, C., Farrington, M., Ho, A. K., ... NEST-UK. (2002). Unilateral transplantation of human primary fetal tissue in four patients with Huntington's disease: NEST-UK safety report ISRCTN no 36485475. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 73(6), 678–85. doi: 10.1136/jnnp.73.6.678
- Rowland, L. P., & Shneider, N. A. (2001). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 344(22), 1688–1700. doi: 10.1056/NEJM200105313442207
- Roy, N. S., Cleren, C., Singh, S. K., Yang, L., Beal, M. F., & Goldman, S. A. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nature Medicine*, 12(11), 1259–68. doi: 10.1038/nm1495
- Sakaguchi, H., Kadoshima, T., Soen, M., Narii, N., Ishida, Y., Ohgushi, M., ... Sasai, Y. (2015). Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nature Communications*, 6, 8896. doi: 10.1038/ncomms9896
- Samuel, R., Daheron, L., Liao, S., Vardam, T., Kamoun, W. S., Batista, A., ... Jain, R. K. (2013). Generation of functionally competent and durable engineered blood vessels from human induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(31), 12774–9. doi: 10.1073/pnas.1310675110
- Sandström, J., Eggermann, E., Charvet, I., Roux, A., Toni, N., Greggio, C., ... Stoppini, L. (2016). Development and characterization of a human embryonic stem cell-

- derived 3D neural tissue model for neurotoxicity testing. *Toxicology in Vitro : An Internat.* doi: 10.1016/j.tiv.2016.10.001
- Santana, I., Farinha, F., Freitas, S., Rodrigues, V., & Carvalho, Á. (2015). Epidemiologia da Demência e da Doença de Alzheimer em Portugal: Estimativas da Prevalência e dos Encargos Financeiros com a Medicação. *Acta Médica Portuguesa*, 28(2), 182–188. Disponível em <http://hdl.handle.net/10400.26/9884>
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., ... Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt–villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), 262–265. doi: 10.1038/nature07935
- Schlachetzki, J. C. M., Pizzo, D. P., Morrisette, D. A., & Winkler, J. (2014). Intracerebroventricular administration of nerve growth factor induces gliogenesis in sensory ganglia, dorsal root, and within the dorsal root entry zone. *BioMed Research International*, 2014, 704259. doi: 10.1155/2014/704259
- Schulz, T. C., Noggle, S. A., Palmarini, G. M., Weiler, D. A., Lyons, I. G., Pensa, K. A., ... Condie, B. G. (2004). Differentiation of human embryonic stem cells to dopaminergic neurons in serum-free suspension culture. *Stem Cells*, 22(7), 1218–38. doi: 10.1634/stemcells.2004-0114
- Schwartz, M. P., Hou, Z., Propson, N. E., Zhang, J., Engstrom, C. J., Santos Costa, V., ... Thomson, J. A. (2015). Human pluripotent stem cell-derived neural constructs for predicting neural toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(40), 12516–21. doi: 10.1073/pnas.1516645112
- Seol, H. J., Jin, J., Seong, D.-H., Joo, K. M., Kang, W., Yang, H., ... Nam, D.-H. (2011). Genetically engineered human neural stem cells with rabbit carboxyl esterase can target brain metastasis from breast cancer. *Cancer Letters*, 311(2), 152–9. doi: 10.1016/j.canlet.2011.07.001
- Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H. P. C., & Livesey, F. J. (2012). Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nature Neuroscience*, 15(3), 477–86, S1. doi: 10.1038/nn.3041
- Shi, Z., Zhang, J., Chen, S., Li, Y., Lei, X., Qiao, H., ... Jiao, J. (2016). Conversion of Fibroblasts to Parvalbumin Neurons by One Transcription Factor, Ascl1, and the Chemical Compound Forskolin. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(26), 13560–70. doi: 10.1074/jbc.M115.709808
- Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., Tanaka, K., & Inoue, Y.

- (1997). Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, 17(23), 9212–9. Disponível em <http://jneurosci.org/content/17/23/9212.long>
- Shim, J.-W., Park, C.-H., Bae, Y.-C., Bae, J.-Y., Chung, S., Chang, M.-Y., ... Lee, S.-H. (2007). Generation of functional dopamine neurons from neural precursor cells isolated from the subventricular zone and white matter of the adult rat brain using Nurr1 overexpression. *Stem Cells*, 25(5), 1252–62. doi: 10.1634/stemcells.2006-0274
- Shtrichman, R., Germanguz, I., & Itskovitz-Eldor, J. (2013). Induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from different cell sources and their potential for regenerative and personalized medicine. *Current Molecular Medicine*, 13(5), 792–805. doi: 10.2174/1566524011313050010
- Singh, S. K., Kagalwala, M. N., Parker-Thornburg, J., Adams, H., & Majumder, S. (2008). REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, 453(7192), 223–7. doi: 10.1038/nature06863
- Smith, A. G. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 435–62. doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.435
- Smith, I., Silveirinha, V., Stein, J. L., de la Torre-Ubieta, L., Farrimond, J. A., Williamson, E. M., & Whalley, B. J. (2015). Human neural stem cell-derived cultures in three-dimensional substrates form spontaneously functional neuronal networks. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. doi: 10.1002/term.2001
- Son, E. Y., Ichida, J. K., Wainger, B. J., Toma, J. S., Rafuse, V. F., Woolf, C. J., & Eggan, K. (2011). Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell*, 9(3), 205–18. doi: 10.1016/j.stem.2011.07.014
- Squire, L., Berg, D., Bloom, F., Lac, S. du, Ghosh, A., & Spitzer, N. (Eds.). (2013). *Fundamental Neuroscience* (4^a). Academic Press.
- Stern, Y., Gurland, B., Tatemichi, T. K., Tang, M. X., Wilder, D., & Mayeux, R. (1994). Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *The Journal of the American Medical Association*, 271(13), 1004–10. doi: 10.1001/jama.1994.03510370056032
- Stevens, L. C. (1970). The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Developmental Biology*, 21(3), 364–82. doi: 10.1016/0012-1606(70)90130-2

- Stichel, C. C., & Müller, H. W. (1998). Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury. *Progress in Neurobiology*, 56(2), 119–148. doi: 10.1016/S0301-0082(98)00033-1
- Storkebaum, E., Lambrechts, D., Dewerchin, M., Moreno-Murciano, M.-P., Appelmans, S., Oh, H., ... Carmeliet, P. (2005). Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nature Neuroscience*, 8(1), 85–92. doi: 10.1038/nn1360
- Stuhlmiller, T. J., & García-Castro, M. I. (2012). Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(22), 3715–37. doi: 10.1007/s00018-012-0991-8
- Suga, H., Kadoshima, T., Minaguchi, M., Ohgushi, M., Soen, M., Nakano, T., ... Sasai, Y. (2011). Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. *Nature*, 480(7375), 57–62. doi: 10.1038/nature10637
- Sundberg, M., Skottman, H., Suuronen, R., & Narkilahti, S. (2010). Production and isolation of NG2+ oligodendrocyte precursors from human embryonic stem cells in defined serum-free medium. *Stem Cell Research*, 5(2), 91–103. doi: 10.1016/j.scr.2010.04.005
- Suslov, O. N., Kukekov, V. G., Ignatova, T. N., & Steindler, D. A. (2002). Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14506–11. doi: 10.1073/pnas.212525299
- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., & Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology*, 11(19), 1553–8. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00459-6
- Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., ... Hashimoto, N. (2005). Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(1), 102–9. doi: 10.1172/JCI21137
- Takahashi, K., Mitsui, K., & Yamanaka, S. (2003). Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 423(6939), 541–5. doi: 10.1038/nature01646
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861–72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019

- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Takamatsu, K., Ikeda, T., Haruta, M., Matsumura, K., Ogi, Y., Nakagata, N., ... Senju, S. (2014). Degradation of amyloid beta by human induced pluripotent stem cell-derived macrophages expressing neprilysin-2. *Stem Cell Research*, 13(3 Pt A), 442–53. doi: 10.1016/j.scr.2014.10.001
- Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., ... Taniguchi, H. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 499(7459), 481–4. doi: 10.1038/nature12271
- Tanzi, R. E., & Bertram, L. (2005). Twenty years of the Alzheimer’s disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*, 120(4), 545–55. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.008
- Temple, S. (1989). Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature*, 340(6233), 471–473. doi: 10.1038/340471a0
- Teng, Y. D., Lavik, E. B., Qu, X., Park, K. I., Ourednik, J., Zurakowski, D., ... Snyder, E. Y. (2002). Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 3024–9. doi: 10.1073/pnas.052678899
- The HD iPSC Consortium. (2012). Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington’s disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell Stem Cell*, 11(2), 264–78. doi: 10.1016/j.stem.2012.04.027
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–7. doi: 10.1126/science.282.5391.1145
- Tropepe, V., Hitoshi, S., Sirard, C., Mak, T. W., Rossant, J., & van der Kooy, D. (2001). Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron*, 30(1), 65–78. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00263-X
- Tuszynski, M. H. (2002). Growth-factor gene therapy for neurodegenerative disorders. *The Lancet Neurology*, 1(1), 51–7. doi: 10.1016/S1474-4422(02)00006-6
- Vadodaria, K. C., Mertens, J., Paquola, A., Bardy, C., Li, X., Jappelli, R., ... Gage, F. H.

- (2016). Generation of functional human serotonergic neurons from fibroblasts. *Molecular Psychiatry*, 21(1), 49–61. doi: 10.1038/mp.2015.161
- Vander, A. J., Sherman, J., & Luciano, D. S. (2001). *Human Physiology: The Mechanisms of Body Function* (8ª). McGraw-Hill.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C., & Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 463(7284), 1035–41. doi: 10.1038/nature08797
- von Campenhausen, S., Bornschein, B., Wick, R., Bö Tzel, K., Sampaio, C., Poewe, W., ... Dodel, R. (2005). Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *European Neuropsychopharmacology*, 15(4), 473–490. doi: 10.1016/j.euroneuro.2005.04.007
- Warner, T. T., & Schapira, A. H. V. (2003). Genetic and Environmental Factors in the Cause of Parkinson's Disease. *Annals of Neurology*, 53(S3), S16–S25. doi: 10.1002/ana.10489
- Watanabe, K., Kamiya, D., Nishiyama, A., Katayama, T., Nozaki, S., Kawasaki, H., ... Sasai, Y. (2005). Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nature Neuroscience*, 8(3), 288–96. doi: 10.1038/nn1402
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A. C., & Reynolds, B. A. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *The Journal of Neuroscience*, 16(23), 7599–609. Disponível em <http://jneurosci.org/content/16/23/7599.full>
- Wenning, G. K., Odin, P., Morrish, P., Rehncrona, S., Widner, H., Brundin, P., ... Lindvall, O. (1997). Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 42(1), 95–107. doi: 10.1002/ana.410420115
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., ... Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 448(7151), 318–24. doi: 10.1038/nature05944
- Wernig, M., Zhao, J.-P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., ... Jaenisch, R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), 5856–61. doi: 10.1073/pnas.0801677105
- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A., & Jessell, T. M. (2002). Directed differentiation

- of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*, 110(3), 385–97. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00835-8
- Wiles, M. V., & Johansson, B. M. (1999). Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Experimental Cell Research*, 247(1), 241–8. doi: 10.1006/excr.1998.4353
- Williams, L. R. (1991). Hypophagia is induced by intracerebroventricular administration of nerve growth factor. *Experimental Neurology*, 113(1), 31–7. doi: 10.1016/0014-4886(91)90143-Z
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810–3. doi: 10.1038/385810a0
- Wilson, P. A., & Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature*, 376(6538), 331–3. doi: 10.1038/376331a0
- Windrem, M. S., Nunes, M. C., Rashbaum, W. K., Schwartz, T. H., Goodman, R. A., McKhann, G., ... Goldman, S. A. (2004). Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nature Medicine*, 10(1), 93–7. doi: 10.1038/nm974
- Wray, S., Self, M., Lewis, P. A., Taanman, J.-W., Ryan, N. S., Mahoney, C. J., ... Hardy, J. (2012). Creation of an Open-Access, Mutation-Defined Fibroblast Resource for Neurological Disease Research. *PLoS One*, 7(8), e43099. doi: 10.1371/journal.pone.0043099
- Xu, L., Yan, J., Chen, D., Welsh, A. M., Hazel, T., Johe, K., ... Koliatsos, V. E. (2006). Human neural stem cell grafts ameliorate motor neuron disease in SOD-1 transgenic rats. *Transplantation*, 82(7), 865–75. doi: 10.1097/01.tp.0000235532.00920.7a
- Xuan, A. G., Long, D. H., Gu, H. G., Yang, D. D., Hong, L. P., & Leng, S. L. (2008). BDNF improves the effects of neural stem cells on the rat model of Alzheimer's disease with unilateral lesion of fimbria-fornix. *Neuroscience Letters*, 440(3), 331–5. doi: 10.1016/j.neulet.2008.05.107
- Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T., ... Suzuki, N. (2011). Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Human Molecular Genetics*, 20(23), 4530–9. doi: 10.1093/hmg/ddr394
- Yan, J., Xu, L., Welsh, A. M., Hatfield, G., Hazel, T., Johe, K., & Koliatsos, V. E. (2007). Extensive neuronal differentiation of human neural stem cell grafts in adult rat spinal cord. *PLoS Medicine*, 4(2), e39. doi: 10.1371/journal.pmed.0040039

- Yan, Y., Yang, D., Zarnowska, E. D., Du, Z., Werbel, B., Valliere, C., ... Zhang, S.-C. (2005). Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23(6), 781–90. doi: 10.1634/stemcells.2004-0365
- Yandava, B. D., Billingham, L. L., & Snyder, E. Y. (1999). “Global” cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), 7029–34. doi: 10.1073/pnas.96.12.7029
- Yang, D., Zhang, Z.-J., Oldenburg, M., Ayala, M., & Zhang, S.-C. (2008). Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats. *Stem Cells*, 26(1), 55–63. doi: 10.1634/stemcells.2007-0494
- Yang, Y., Jiao, J., Gao, R., Yao, H., Sun, X.-F., & Gao, S. (2013). Direct conversion of adipocyte progenitors into functional neurons. *Cellular Reprogramming*, 15(6), 484–9. doi: 10.1089/cell.2013.0013
- Yasuhara, T., Matsukawa, N., Hara, K., Yu, G., Xu, L., Maki, M., ... Borlongan, C. V. (2006). Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson’s disease. *The Journal of Neuroscience*, 26(48), 12497–511. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3719-06.2006
- Ying, Q.-L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., & Smith, A. (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature Biotechnology*, 21(2), 183–6. doi: 10.1038/nbt780
- Yoo, A. S., Sun, A. X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., ... Crabtree, G. R. (2011). MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*, 476(7359), 228–31. doi: 10.1038/nature10323
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917–20. doi: 10.1126/science.1151526
- Yuan, X., Hu, J., Belladonna, M. L., Black, K. L., & Yu, J. S. (2006). Interleukin-23-expressing bone marrow-derived neural stem-like cells exhibit antitumor activity against intracranial glioma. *Cancer Research*, 66(5), 2630–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1682
- Zhang, S.-C. (2003). Embryonic stem cells for neural replacement therapy: prospects and challenges. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 12(6), 625–34. doi: 10.1089/15258160360732650
- Zhang, S.-C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brüstle, O., & Thomson, J. A. (2001). In vitro

- differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(12), 1129–33. doi: 10.1038/nbt1201-1129
- Zhang, S.-Z., Ma, L.-X., Qian, W.-J., Li, H.-F., Wang, Z.-F., Wang, H.-X., & Wu, Z.-Y. (2016). Modeling Neurological Disease by Rapid Conversion of Human Urine Cells into Functional Neurons. *Stem Cells International*, 2016, 2452985. doi: 10.1155/2016/2452985
- Zhao, D., Najbauer, J., Annala, A. J., Garcia, E., Metz, M. Z., Gutova, M., ... Aboody, K. S. (2012). Human neural stem cell tropism to metastatic breast cancer. *Stem Cells*, 30(2), 314–25. doi: 10.1002/stem.784
- Zhao, J., He, H., Zhou, K., Ren, Y., Shi, Z., Wu, Z., ... Jiao, J. (2012). Neuronal transcription factors induce conversion of human glioma cells to neurons and inhibit tumorigenesis. *PloS One*, 7(7), e41506. doi: 10.1371/journal.pone.0041506
- Zhao, X., Li, W., Lv, Z., Liu, L., Tong, M., Hai, T., ... Zhou, Q. (2009). iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 461(7260), 86–90. doi: 10.1038/nature08267
- Zhao, Y., & Wang, S. (2010). Human NT2 neural precursor-derived tumor-infiltrating cells as delivery vehicles for treatment of glioblastoma. *Human Gene Therapy*, 21(6), 683–94. doi: 10.1089/hum.2009.196
- Zheng, C., Nennesmo, I., Fadeel, B., & Henter, J.-I. (2004). Vascular endothelial growth factor prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Annals of Neurology*, 56(4), 564–7. doi: 10.1002/ana.20223
- Zhu, Y., Carido, M., Meinhardt, A., Kurth, T., Karl, M. O., Ader, M., ... Tanaka, E. (2013). Three-Dimensional Neuroepithelial Culture from Human Embryonic Stem Cells and Its Use for Quantitative Conversion to Retinal Pigment Epithelium. *PLoS One*, 8(1), e54552. doi: 10.1371/journal.pone.0054552